

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

*Reprodukční izolace diploidů a tetraploidů druhu *Vicia cracca*
a možnosti evoluce tohoto agregátu*

Praha 2015

Bc. Zuzana VLČKOVÁ

Vedoucí práce: doc. RNDr. Zuzana MÜNZBERGOVÁ, PhD.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu na tému Reprodukční izolace diploidů a tetraploidů druhu *Vicia cracca* a možnosti evoluce tohoto agregátu vypracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru.

V.....dňa.....

Podpis:

Podakovanie

Chcela by som sa poďakovať doc. RNDr. Zuzane Münzbergovej, PhD. za odborné vedenie, ochotu a cenné rady, ktoré mi poskytla počas písania práce; konzultantke Mgr. Ladislave Paštovej za odbornú pomoc pri *in situ* hybridizácii; Mgr. Blanke Vlasákovej, PhD. za metodické rady pri skúmaní opelovačov; rodičom a súrodencom za oporu a povzbudenie.

Abstrakt

Diplomová práca sa zaoberá reprodukčnými bariérami v diploidno-polyploidnom komplexe *Vicia cracca*. Komplex so základným chromozómovým číslom $x=7$ zahŕňa diploidy ($2x=14$), tetraploidy ($4x=28$) a vzácné triploidy ($3x=21$). Skúmala som prereprodukčné bariéry medzidiploidmi a tetraploidmi: fenológiu, správanie opelovačov (preferencia druhov voči jednotlivým ploidiam, poradie navštevovaných ploidii), premenné, ktoré by správanie opelovačov mohli vysvetliť (množstvo nektáru ako hlavnej odmeny a veľkosť a počet peľových zŕn ako potenciálnej odmeny). V zmiešaných populáciách som analyzovala ploidiu semien a semenáčikov, aby sa zistilo aký silný je triploidný blok. Ako najsilnejšia reprodukčná bariéra sa ukázala priestorová izolácia. Veľmi významne prispieva aj správanie opelovačov, fenológia kvitnutia iba minimálne. Koeficient vyjadrujúci mieru všetkých prereprodukčných bariér, je 0,956. Na jednej lokalite *Bombus pascuorum* preferoval tetraploidy a *Andrena* sp. diploidy, iné testy neukázali preferenciu opelovačov voči tetraploidom aj napriek tomu, že tetraploidy produkujú viac nektáru. Metódou *in situ* hybridizácie som pripravila jeden roztlak diploidnej *V. cracca*. Metóda vyžaduje ďalšiu optimalizáciu pre študovaný taxón.

Kľúčové slová: *Vicia cracca*, reprodukčné bariéry, zmiešané diploidno-tetraploidné populácie, správanie opelovačov, *in situ* hybridizácia

Abstract

Master thesis investigates reproductive barriers in diploid-polyploid complex of *Vicia cracca*. Complex with basic chromosome number $x=7$ consists of diploid ($2x=14$), tetraploid ($4x=28$) and rare triploid ($3x=21$) cytotype. I studied prereproductive barriers between diploid and tetraploid cytotype: phenology of flowering, pollinators' behavior (preference of species of pollinators to cytotypes, sequence of visited cytotypes), variables, that could explain pollinators' behavior (amount of nectar as the main reward, size and amount of pollen grains as a potential reward). To find out how strong the triploid block is I analyzed ploidy of seeds and seedlings from mixed-ploidy population. The habitat isolation showed up to be the strongest reproductive barrier. Pollinator's behavior meaningfully contributes to isolation, phenology of flowering contributes only minimally. Index expressing rate of prereproductive barriers is 0,956. Pollinator *Bombus pascuorum* visited on one locality preferably tetraploid plants and *Andrena* sp. preferred diploid plants. Even though tetraploid plants produce more nectar, no other analysis showed pollinators' preference to tetraploid plants. I prepared one squash of diploid *V. cracca* using method of in situ hybridization. This method needs to be optimized for the studied taxon.

Key words: *Vicia cracca*, reproductive barriers, mixed diploid-tetraploid populations, pollinators' behavior, *in situ* hybridization

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Reprodukčné bariéry a ich význam	1
1.2	In situ hybridizácia – princíp a možnosti využitia metódy	9
1.3	Ciele práce	12
2	Metodika.....	14
2.1	Študovaný taxón	14
2.2	Reprodukčné bariéry	17
2.2.1	Určovanie úrovne ploidie	17
2.2.2	Fenologická izolácia	17
2.2.3	Správanie opel'ovačov	17
2.2.4	Analýza semien zo zmiešanej populácie.....	19
2.2.5	Produkcia a zloženie nektáru	21
2.2.6	Veľkosť peľových zŕn a ich množstvo.....	21
2.2.7	Umelé kríženie	21
2.3	In situ hybridizácia.....	23
2.4	Analýza dát	25
2.4.1	Fenologická izolácia	25
2.4.2	Správanie opel'ovačov	25
2.4.3	Produkcia nektáru	28
2.4.4	Veľkosť peľových zŕn a ich množstvo.....	29
2.4.5	Zložky reprodukčnej izolácie	30
3	Výsledky.....	31
3.1	Reprodukčné bariéry	31
3.1.1	Analýza semien a semenáčikov zo zmiešanej populácie	31
3.1.2	Fenologická izolácia	33

3.1.3	Priestorová izolácia.....	34
3.1.4	Správanie opel'ovačov	34
3.1.5	Produkcia nektáru	37
3.1.6	Veľkosť peľových zŕn a ich množstvo	37
3.1.7	Umelé kríženie.....	39
3.1.8	Zložky reprodukčnej izolácie.....	39
3.2	In situ hybridizácia	40
4	Diskusia.....	41
5	Záver	45
6	Použitá literatúra:	46
	Príloha A: Protokoly k ISH	52

Zoznam použitých skratiek

ANOVA – analýza rozptylu (z angl. Analysis of Variance)

DAPI – 4',6-diamidín-2-fenylindol (fluorescenčné farbivo)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)

FISH – fluorescenčná in situ hybridizácia

GISH – genómová in situ hybridizácia

GLM – zobecnený lineárny model (z angl. general linear model)

ISH – in situ hybridizácia

RNA – ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)

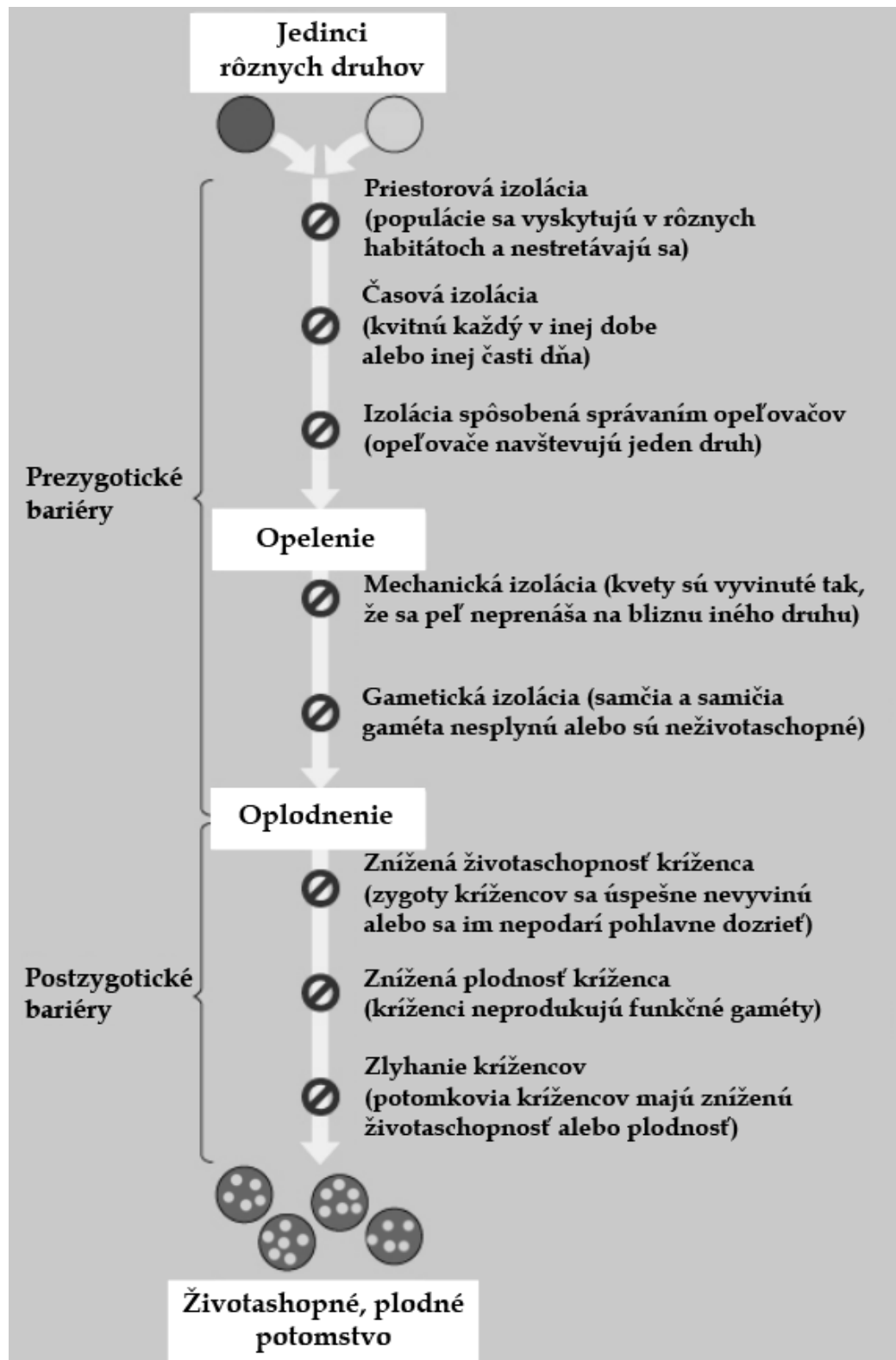
UV – ultrafialové (z angl. ultraviolet)

1 Úvod

1.1 Reprodukčné bariéry a ich význam

Reprodukčné bariéry sú súbor mechanizmov a fyziologických procesov, ktoré bránia jedincom rôznych druhov vo vzájomnom krížení, produkcii potomkov alebo aspoň zabezpečujú, že je potomok neplodný. Tieto bariéry udržujú integritu druhu v čase redukciou alebo priamym bránením toku génov medzi jedincami rôznych druhov. Tým sa zachovávajú vlastnosti daného druhu. Reprodukčné bariéry môžu byť prezygotické a postzygotické (Rieseberg & Carney, 1998). Prezygotické bariéry (rozdelenie reprodukčných bariér je na obr. 1, prezygotické sú pred oplodnením) sú pre organizmus výhodnejšie, pretože sa zbytočne neplytvá gamétami. Do tejto skupiny patrí časová a priestorová izolovanosť (rozdielna doba kvitnutia, rôzne stanovište), správanie opel'ovačov, či mechanická izolácia a izolácia konkurenčných gamét. Medzi postzygotické bariéry patrí neživotaschopnosť zygoty, príp. hybridu a sterilita hybridu (Coyne & Orr, 1998). Reprodukčné bariéry sú tradične medzidruhový problém, v poslednej dobe sa však objavuje veľa štúdií polyploidov, ktoré sa ním zaoberajú tiež. Bariéry v krížení medzi cytotypmi jedného druhu môžu pomôcť novovzniknutému polyploidovi udržať sa v populácii a vyhnúť sa tzv. minority cytotype exclusion (vylúčeniu menšinového cytotypu) (Baack 2005). Ďalšou výhodou existencie bariér je neplytvanie gamét na medzicytotypové krížence, ktoré sú často neživotaschopné alebo aspoň neplodné. Tieto bariéry môžu byť rovnaké ako bariéry medzi druhmi.

Jednou z prezygotických bariér je priestorová izolovanosť. Ak majú diploidy a polyploidy oddelené areály rozšírenia, jediné miesto, kde môže dôjsť k toku génov, je hybridná zóna. Hybridná zóna môže byť buď primárna alebo sekundárna. Primárna hybridná zóna je miesto, kde sa dotýkajú areály rozšírenia druhov, ktoré vznikli zo spoločného predka alopatricky alebo peripatricky. Areály rozšírenia jednotlivých druhov však nie sú stále a v závislosti od zmien prírodných podmienok sa rôzne menia alebo presúvajú. Tak sa postupom času môžu dostať do tesného kontaktu druhy, ktorých areály sa pôvodne neprelínali. Ak už majú tieto druhy vyvinuté rozmnožovacie bariéry, vznikne na tomto mieste sekundárna hybridná zóna.



Obr. 1 Rozdelenie reprodukčných bariér (upravené podľa web 3)

Ďalšou z prezygotických bariér medzi rôznymi cytotypmi je doba kvitnutia (Jersáková *et al.* 2010, Castro *et al.* 2011, Husband & Shemshke 2000, Segraves &

Thompson 1999). Fenológia sa najčastejšie skúma na vzorke 100 jedincov, prípadne pozorovaním celej populácie. V intervale 3 až 15 dní najčastejšie počas celej vegetačnej sezóny sa sleduje počet otvorených kvetov, príp. dátum, kedy začne rastlina kvitnúť a doba kvitnutia. Fenologický prekryv rôznych cytotypov bol v prípade *Aster amellus* a *Gymnadenia conopsea s.l.* veľký (Castro *et al.* 2011, Jersáková *et al.* 2010), v prípade *Chamerion angustifolium* 50% (Husband & Shemshke 2000). Zaujímavý je výsledok štúdie na *Heuchera grossulariifolia*, ktorá má diploidný a tetraploidný cytotyp. Dĺžka kvitnutia sa nelíšila, ale doba kvitnutia sa nikdy úplne neprekrývala. Prekvapivé je, že v záhradných podmienkach začal kvitnúť diploid o 5 dní skôr, zatiaľčo na lokalite Salmon River kvitli o 8 dní skôr tetraploidy (Segraves & Thompson 1999). Populácie *Libidibia ferrea* kvitli okolo 3 mesiacov, jednotlivé stromy však len niečo vyššie mesiaca. Kvitnutie diploidov a tetraploidov bolo asynchrónne v rámci aj medzi cytotypmi. Na lokalite, kde sa vyskytovali oba cytotypy, kvitlo len niekoľko tetraploidných jedincov v čase, keď aj diploidy (Borges *et al.* 2012). Diploidy a tetraploidy *Arrhenatherum elatius* sa signifikantne líšili v dobe počiatočného kvitnutia (Petit *et al.* 1997). Všetky okrem 2 tetraploidných genotypov prestali kvitnúť skôr ako začali kvitnúť prvé diploidy. Trvanie kvitnutia bolo signifikantne dlhšie u tetraploidov. Z fenológie diploidov a polyploidov teda nemožno určiť jednoznačný trend. Niekedy kvitnú skôr diploidy, niekedy polyploidy, doba ich kvitnutia sa takmer vždy prekrýva.

Ďalším rozdielom medzi cytotypmi potenciálne fungujúcim ako prezygotická bariéra môže byť množstvo a kvalita nektáru. Nektár je spolu s peľom najdôležitejšia odmena, ktorú krytosemenné rastliny ponúkajú opel'ovačom, aby zaplatili za ich služby (Simpson & Neff, 1983). Jeho zloženie a množstvo môže ovplyvniť atraktivitu kvetov pre opel'ovačov. Davis *et al.* (1996) skúmali nektár allotetraploidnej *Brassica napus* a *B. rapa*, ktorá má 3 úrovne ploidie: haploidnú, diploidnú a tetraploidnú. Zmerali množstvo nektáru u všetkých ploidii. U *B. rapa* množstvo nektáru záviselo od úrovne ploidie: najviac nektáru produkovali nektáriá kvetov tetraploidov, najmenej haploidov. Davis *et al.* (1994) skúmali zloženie nektáru vyššie uvedených druhov. Nektár je tvorený prevažne glukózou a fruktózou, ich obsah však nie je závislý na ploidii. Rozdiely v množstve nektáru medzi cytotypmi jedného druhu by mohli mať význam ako reprodukčná bariéra. Napríklad kvety s väčším množstvom nektáru (pravdepodobne kvety polyploidov) by mohli lákať väčších opel'ovačov alebo by mohli byť pre opel'ovačov atraktívnejšie a mohli by ich navštevovať častejšie ako diploidné kvety.

Peľ ako odmena pre opel'ovače môže mať tiež vplyv na ich správanie. Viacero štúdií ukazuje, že polyploidy majú väčšie bunky ako diploidy (Segraves & Thompson 1999, Stebbins 1950, Stebbins 1971). U rastlín sa veľkosti dvoch neredukčne sa deliacich typov buniek, obličkovej bunky prieduchu a peľových zŕn (Nagl, 1978), bežne používa na určenie úrovne ploidie blízko príbuzných diploidných a polyploidných druhov. Butterfass (1987) vo svojej "review" uvádza, že veľkosť peľových zŕn u tetraploidov je priemerne 1,49 až 2,11-krát väčšia ako u ich diploidných príbuzných. Výnimočne sa veľkosť peľových zŕn u diploidov a polyploidov môže prekrývať, čo sťažuje presné odhadnutie úrovne ploidie v niektorých prípadoch (napr. Lewis 1980, Small 1983, Butterfass, 1987, Brochmann, 1992, Tate & Simpson 2004). Tate & Simpson (2004) sa domnievajú, že menší peľ u tetraploidov rodu *Tarasa* (*Malvaceae*) sa dá vysvetliť zmenou životnej formy z trvaliek u diploidov na jednoročné rastliny u tetraploidov a zmenou spôsobu opel'ovania z xenogamie u diploidov na autogamiu u tetraploidov. Ak by veľkosť peľových zŕn bola závislá od ploidie aj u skúmaného druhu a zároveň by ich bol na tyčinkách rovnaký počet alebo by sa ich tvorilo viac (bez ohľadu na zmenu veľkosti), boli by tetraploidy teoreticky atraktívnejšie pre opel'ovačov. Peľ je primárne zložka rozmnožovacieho systému, odmena je jeho sekundárna funkcia. Jeho zloženie preto nie je, na rozdiel od nektáru, ktorého primárnou funkciou je nasýtiť opel'ovače, priamo korelované s potrebami opel'ovačov.

Veľmi účinnou prereprodukčnou bariérou medzi cytotypmi môže byť správanie opel'ovačov. Dôvodom špecializácie opel'ovačov na jednotlivé ploidie by mohlo byť rozdielne sfarbenie kvetov, iná alebo výraznejšia vôňa, rôzne množstvo peľu alebo nektáru, ktoré slúžia ako odmeny. Polyploidné druhy sa môžu špecializovať na iný druh opel'ovača ako materský diploid, aby zabránili kríženiu a tým možnému vyhynutiu jednej z ploidii. Opel'ovači sú vždy pozorovaní v období kvitnutia oboch cytotypov v tú časť dňa, kedy kvety navštevuje najviac opel'ovačov. Zaznamenáva sa druh opel'ovača, počet navštívených kvetov na rastline a poradie cytotypov, ktoré daný jedinec navštívil. Správanie opel'ovačov *Aster amellus* sa signifikantne líšilo medzi cytotypmi aj medzi študovanými populáciami. Viac variability ako cytotyp však vysvetlili populácie. V prítomnosti oboch cytotypov nebola pozorovaná preferencia opel'ovačov k jednému z cytotypov (Castro *et al.* 2011). V štúdiu Husband & Shemshke (2000) boli kvety tetraploidov navštevované častejšie ako keby sa hmyz správal náhodne. Prelietavanie z kvetu na kvet medzi kvetmi rovnakej ploidie bolo častejšie ako sa predpokladalo podľa modelu náhodného správania. Len 15,5% letov

bolo medzi kvetmi rôznych ploidii oproti predpokladaným 49%. Podľa výsledkov štúdie (Segraves & Thompson, 1999) sa návštevnosť kvetov medzi ploidiami *Heuchera grossulariifolia* nelíšila. Obidva cytotypy boli priemerne navštívené 1,3-krát za dobu pozorovania (30 min). Kombinácia opel'ovačov, ktoré navštívili danú rastlinu sa však medzi cytotypmi signifikantne líšila. Jedince druhu *Heuchera grossulariifolia* boli navštevované 15 druhmi alebo skupinami hmyzu, z toho 6 navštevovalo jednu z ploidii častejšie ako druhú. Príkladom je rod *Lasioglossum*, ktorý predstavoval štvrtinu návštev diploidov, ale iba desatinu návštev tetraploidov. Naopak, *Bombyllius major* navštevoval 6,4-krát častejšie kvety tetraploidov ako diploidov. Ako efektívnych opel'ovačov tetraploidov aj diploidov druhu *Libidibia ferrea* označili Borges *et al.* (2012) tri druhy včiel. Ďalšie dva druhy včiel boli zaradené do kategórie príležitostných opel'ovačov. Jeden druh včely sa niekedy správal ako príležitostný opel'ovač, inokedy ako zlodej nektáru. Kolibríky, ktoré tiež občas navštevovali väčšie kvety tetraploidov, sa správali ako príležitostní opel'ovači.

Ďalšou bariérou v krížení môžu byť rozdiely v morfológii kvetov (Jersáková *et al.* 2010, Segraves & Thompson 1999, Husband & Shemshke 2000). Jediný morfológický znak – dĺžku ostrohy merali u cytotypov *Gymnadenia conopsea* s.l. (Jersáková *et al.* 2010). Naproti tomu Segraves & Thompson (1999) merali 9 rôznych vzdialeností, ktoré komplexne charakterizujú morfológiu kvetu *Heuchera grossulariifolia*. Husband a Shemshke (2000) merali 4 charakteristiky druhu *Chamerion angustifolium*. Vo všetkých spomenutých štúdiách boli signifikantné rozdiely medzi diploidmi a polyploidmi. Morfológia kvetov diploidov a tetraploidov *Libidibia ferrea* je podobná, ale sú medzi nimi signifikantné rozdiely (Borges *et al.* 2012). Tetraploidy majú vo všeobecnosti vyššie hodnoty meraných charakteristík.

Ďalšou bariérou v krížení môže byť sila potrebná k otvoreniu kvetu nejakým silovým mechanizmom. Nenašla som štúdiu, ktorá by sa touto tematikou zaoberala v rámci cytotypov jedného druhu. Zaujímavou štúdiou týchto mechanizmov je porovnávacia štúdia na *Fabaceae*. Koruna tejto čeľade pozostáva zo striedky, dvoch krídel a člnku, ktorý vznikol zrastením dvoch korunných lupienkov, reprodukčné orgány sú kryté člnkom (Córdoba & Cocucci 2011). Opel'ovač sa dostane k odmene tak, že odtlačí bočné a spodné korunné lupienky, ktoré sú pohyblivé, smerom nadol. Tak sa odkryjú reprodukčné orgány aj odmena a dostanú sa do kontaktu so spodnou stranou opel'ovača. U viacerých druhov z čeľade *Fabaceae* Córdoba & Cocucci (2011) skúmali silu potrebnú k otvoreniu ich kvetov a hľadali

súvislosť so silou, ktorú opel'ovači dokážu vyvinúť. Pomocou prístroja, ktorý si zhotovili, odmerali silu potrebnú, aby sa hmyz dostal k reprodukčným orgánom. Potom naskenovali korunné lupienky a u každého merali 4 znaky: dĺžku a šírku lupienku a šírku nechty (zúžená časť pri báze lupienku) pri báze a uprostred. Ďalej zmerali hmotnosť a silu opel'ovačov, ktorí boli pozorovaní pri opel'ovaní. Pozorovali, že opel'ovači (okrem jedného druhu) boli schopní vyvinúť oveľa väčšiu silu ako bolo potrebné, aby sa dostali k odmene. Boli nájdené silné korelácie medzi jednotlivými morfometrickými znakmi a medzi morfometrickými znakmi a potrebnou silou na otvorenie kvetu. Obzvlášť silné boli korelácie medzi znakmi krídel a člnku, ktoré sa najviac podieľajú na otváracom mechanizme kvetu.

Súhrn všetkých bariér môžeme zistiť sledovaním semien na rastlinách v zmiešaných populáciách. Analýzou ploidie semien alebo naklíčených semenáčikov za predpokladu, že rastliny sú opelené umelo (bariéry typu rôzna doba kvitnutia, priestorová segregácia, preferencie opel'ovačov sú eliminované) môžeme získať informácie o postzygotických bariérach medzi cytotypmi. Preto niektoré štúdie skúmajú aj semená z prirodzene opel'ovaných zmiešaných populácií aj umelo opel'ujú (Castro *et al.* 2011, Borges *et al.* 2012).

Najskôr sa pozrieme na to ako sa študuje opel'ovanie v prirodzených podmienkach. Castro *et al.* (2011) využili k zisteniu schopnosti vzájomného kríženia medzi cytotypmi umelú zmiešanú populáciu. Rastliny nechali opel'ovať miestnym hmyzom (opel'ovanie hmyzom – preferencie opel'ovačov nie sú eliminované, pokus skúma aj prezygotické bariéry), ktorý bol viac-menej rovnaký ako na pôvodných lokalitách. Rovnako ako Husband a Shemshke (2000) zmerali časť semien študovaných rastlín na cytometri a zvyšok použili na klíčiaci pokus, aby následne zistili ploidiu semenáčikov. Z výsledkov štúdie (Castro *et al.* 2011) je prekvapivé, že hexaploidné matky mali vysoké percento aneuploidných semien (medzi penta- a hexaploidmi, 80 %). Diploidy mali väčšinu potomkov diploidných (80 % semien). Husband a Shemske (2000) dokázali zo zbieraných dát zistiť závislosť produkcie semien na dobe kvitnutia. Produkcia semien diploidných rastlín bola významne vyššia u tých, ktoré kvitli len s inými diploidmi. Naopak, produkcia semien tetraploidov bola výrazne vyššia u tých ktoré kvitli spolu s diploidmi. Tento fakt by mohol súvisieť s tým, že v čase, keď kvitnú oba cytotypy, uprednostňujú opel'ovači tetraploidné rastliny. Zo 160 semenáčikov, ktoré vzišli zo semien zozbieraných z diploidných rastlín, ktoré kvitli len s inými diploidmi, bol jeden triploid. Zo 60 semenáčikov diploidov a tetraploidov, ktoré

kvitli súčasne, boli 4 triploidné. Frekvencia úspešného medzicytotypového kríženia v období kvitnutia oboch cytotypov je 6,6 %.

Alternatívny prístup použili Borges *et al.* (2012), ktorí skúmali systém rozmnožovania študovaného druhu pomocou kontrolovaných opel'ovacích pokusov. Vybrané kvety boli buď ručne samoopelené, opelené peľom z iného jedinca rovnakej ploidie alebo opelené peľom jedinca inej ploidie. Pre porovnanie boli pozorované aj kvety opel'ované prirodzene. Podľa výsledkov štúdie Borges *et al.* (2012) netvorili diploidné jedince *Libidibia ferrea* plody po samoopelení, ale plodili dosť úspešne po opelení inými jedincami rovnakej ploidie. Tetraploidné jedince tvorili malé množstvo plodov po samoopelení (okolo 2 %) a podobné množstvo po opelení iným jedincom rovnakej ploidie. Po krížení rastlín s rôznou ploidiou nevznikli žiadne semená. Diploidy aj tetraploidy tvorili prirodzene málo plodov (asi 4 %). Následne bola vypočítaná úspešnosť reprodukcie ako pomer percent plodov vyprodukovaných prirodzenou cestou a tých, ktoré vzišli z opel'ovacích pokusov. Vzhľadom na rozdiely v produkcii plodov po opel'ovacích pokusoch sa úspešnosť reprodukcie cytotypov výrazne líšila, u diploidov bola 0,16, zatiaľ čo u tetraploidov 0,69. Tiež porovnali počet semien v plode. Diploidy tvorili viac semien na plod ako tetraploidy.

Porovnanie všetkých reprodukčných bariér u *Aster amellus* ukázalo, že najvýznamnejšie sú bariéry po opelení (izolácia gamét, nízka životnosť hexaploidných semien a/alebo neschopnosť tetraploidných rastlín dokončiť životný cyklus) a druhým najvýznamnejším faktorom je priestorová segregácia (Castro *et al.* 2011). U *Gymnadenia conopsea* nebola okrem čiastočnej bariéry vyplývajúcej z fenológie kvitnutia nájdená ďalšia prekážka v krížení cytotypov. Z toho vyplýva, že u tohto druhu budú tiež prevládať postzygotické bariéry (Jersáková *et al.* 2010). U *Chamerion angustifolium* mali podľa vyššie spomenutej štúdie (Husband & Shemshke 2000) signifikantný vplyv na prezygotické bariéry v zmiešaných populáciách fenológia kvitnutia a správanie opel'ovačov. Veľmi zaujímavý pohľad na reprodukčné bariéry medzi ploidiami tohto taxónu ponúka "review" autorov Husband & Sabara (2003), ktorí reprodukčné bariéry rozdelili na viacero zložiek: geografická izolovanosť, rôzna doba kvitnutia, vernosť opel'ovačov, selekcia gamét a postzygotické bariéry; následne každú zložku vyjadrili pomocou koeficientu a výslednú úroveň reprodukčných bariér medzi ploidiami *Chamerion angustifolium* vyjadrili ako

kombináciu týchto zložiek. Táto výsledná úroveň bola 0,997, k čomu najviac relatívne prispela priestorová izolovanosť (41 %) a vernosť opel'ovačov (44 %).

V tejto diplomovej práci som sa zamerala na štúdium rodu *Vicia*, sekcia *Cracca*. Študovala som reprodukčné bariéry medzi diploidným a tetraploidným cytotypom druhu *V. cracca*. Tetraploidný cytotyp tohto druhu pravdepodobne vznikol autopolyploidizáciou diploidnej *V. cracca* (Eliášová 2008). Túto hypotézu som overovala pomocou metódy *in situ* hybridizácia. Pomocou tejto metódy budem skúmať aj ďalšie druhy sekcie *Cracca*.

1.2 *In situ* hybridizácia – princíp a možnosti využitia metódy

In situ hybridizácia (ISH) je naviazanie označeného komplementárneho DNA alebo RNA vlákna (sondy) na DNA alebo RNA (*in situ*) skúmaného pletiva/tkaniva (cieľovú DNA/RNA) na mikroskopickom sklíčku. Genómová in situ hybridizácia (ďalej len GISH) je druh in situ hybridizácie, pri ktorej sa ako fluorescenčne značená sonda použije úplná DNA genómu. Používa sa na určenie evolučných predkov polyploidov (Renny-Byfield *et al.* 2010) a hybridov (Tu *et al.* 2009; Tang *et al.* 2010) a pri skúmaní introgresie (Harper *et al.* 2011). Metodika je v prípade štúdia polyploidov a hybridov rovnaká: ako sonda sa použije úplná genómová DNA potencionálneho predka skúmaného jedinca (polyploida alebo hybridu) a ako cieľová DNA roztlak chromozómov skúmaného jedinca. Niekedy sa používa počas hybridizácie aj prímies tzv. blokovej DNA (DNA druhého potenciálneho predka), ktorá nie je fluorescenčne značená, aby sonda hybridizovala len na DNA, ktorá je plne komplementárna. GISH vo svojej štúdii použili Renny-Byfield *et al.* (2010) na charakterizovanie kompozície a distribúcie genómu a zistenie úrovne ploidie jedincov rodu *Spartina* na dvoch lokalitách blízko South Hamptonu v južnom Anglicku. Rod *Spartina* vykazuje častú hybridizáciu a zahŕňa klasické príklady nedávneho vzniku nových druhov prostredníctvom allopolyploidie. Vo Veľkej Británii sú dva hexaploidné druhy *S. maritima* a *S. alterniflora*, ako aj homoploidný hybrid *S. ×townsentii* ($2n = 60$) a odvodený allododekaploid *S. anglica* ($2n = 120, 122, 124$). V štúdii Marasek *et al.* (2004) pomocou GISH overujú, či rastliny získané krížením dvoch kultivarov druhu *Lilium henryi* sú krížence, keďže v rode *Lilium*, nie sú všetky rastliny, ktoré vzniknú krížením (obzvlášť medzi vzdialenými príbuznými), krížence, pretože embryo sa môže vyvinúť apomikticky. Tieto rastliny potom obsahujú genetický materiál len od materskej rastliny. Ďalšou metódou použitou na overenie hybridného pôvodu bola fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH) so sondami 5S rDNA a 25S rDNA. Na základe genómovo-špecifického umiestnenia rDNA lokusov vybrané chromozómové markery boli použité na analýzu F1 krížencov medzi kultivarmi. Liu & Gu (2011) pomocou GISH skúmali organizáciu a evolúciu genómu *Camelia reticulata*. *C. reticulata* je svetoznáma ozdobná kvitnúca rastlina. Má tri úrovne ploidie: diploidnú, tertraploidnú a hexaploidnú so základným chromozómovým číslom $x=15$. Hypotetický allopolyploidný pôvod a rodičovské genómy boli neznáme, takže Liu & Gu (2011) použili ako sondy kompletne genómové DNA blízko príbuzných diploidných druhov *C. pitardii* a *C. saluenensis* a v prítomnosti blokujúcej DNA boli tieto sondy

nahybridizované na chromozómové roztlaky *C. reticulata*. Bailey *et al.* (1993) použili GISH na určenie rodičovských chromozómov trávy \times *Festulpia hubbardij* ($2n=5x=35\pm 2B$), prirodzene sa vyskytujúcim pentaploidným hybridom medzi *Festuca rubra* ($2n=6x=42\pm 2B$) a *Vulpia fasciculata* ($2n=4x=28$). Biotínom značená kompletná genómová DNA *V. fasciculata* a nadbytok neoznačenej genómovej DNA *F. rubra* ako blok hybridizovali na mitotické chromozómy kríženca. Renny-Byfield *et al.* (2010) identifikovali pomocou GISH u nonaploidného jedinca 62 chromozómov *S. alterniflora* a 30 zo *S. maritima* a u jedinca *S. anglica* približne po 60 chromozómov *S. maritima* a *S. alterniflora*. Prítomnosť markerov charakteristických pre rodičovské genotypy a výsledky GISH potvrdili, že rastliny získané krížením kultivarov *L. henryi* boli naozaj krížence (Marasek *et al.* 2004). Podľa výsledkov štúdie Liu & Gu (2011) sonda *C. pitardii* sfarbila časť genómov tetraploidnej a hexaploidnej *C. reticulata*, sonda *C. saluenensis* vykreslila časť genómu hexaploidnej *C. reticulata*. Tieto pozorovania sú jasným dôkazom allopolyploidného pôvodu genómov *C. reticulata* a ukazujú, že tetraploidná *C. reticulata* vznikla krížením medzi diploidnou *C. reticulata* a *C. pitardii* a hexaploidná *C. reticulata* vznikla následným krížením medzi allotetraploidnou *C. reticulata* a *C. saluenensis*. Bailey *et al.* (1993) pomocou GISH potvrdili, že 14 z 35 chromozómov \times *Festulpia hubbardij* zdedil kríženec od *V. fasciculata* a zvyšných 21 a dva B chromozómy od *F. rubra*. GISH umožňuje identifikovať chromatin vo všetkých regiónoch pozdĺž chromozómov študovaného druhu a tým umožňuje testovať teóriu prenosu genetického materiálu medzi druhmi *F. rubra* a *V. fasciculata* prostredníctvom introgresívneho kríženia.

Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH) je druh ISH, pri ktorom sa ako sonda používa špecifický úsek DNA (napr. telomérové sondy (TTAGGG)_n). Má široké využitie, okrem iného sa používa pri štúdiu centrických fúzií. Rosa *et al.* (2012) skúmali karyotypy a chromozómový polymorfizmus u *Rineloricaria lima* pomocou tradičných metód (farbenie Giemsou, "C-banding" a impregnácia striebrom) a FISH so sondami 18S rDNA, 5S rDNA a telomérovými sondami (TTAGGG)_n. Pellegrino *et al.* (2009) študovali po prvý krát chromozómy juhoamerických gekónov otvorených a suchých oblastí *Gymnodactylus amarali* a *G. geckoides*. Použili metódy tradičné farbenie, farbenie striebrom, CBG- a RBG-"banding" a FISH s telomerickými sekvencami. Rosa *et al.* (2012) objavili rôznorodosť v počte chromozómov u analyzovaných populácií. Vyslovili hypotézu, že jedna vetva *Rineloricaria*, ktorá mala pôvodne počet chromozómov $2n=54$, pôvodný pre celú podčelad'

sa diverzifikovala prostredníctvom centrických rozpadov, čím vznikli nestabilné miesta v zlomových bodoch. Tieto nestabilné miesta mohli vyvolať Robertsonovské fúzie, ktoré vyústili do dnes pozorovaného polymorfizmu v počte chromozómov. Pellegrino *et al.* (2009) prišli k záveru, že polymorfizmus v počte chromozómov u *G. amarali* ($2n=38, 39$ a 40) je výsledkom centrickej fúzie, pôvodný chromozómový počet bol $2n=40$. Použitie FISH s telomerickými sekvenciami ako sondami v tejto štúdii umožnilo identifikovať telomerické sekvencie nielen v telomerickej oblasti, čo naznačovalo, že dané chromozómy vznikli centrickou fúziou.

Z vyššie uvedených štúdií vyplýva, že metódy FISH a GISH sú užitočné a úspešne používané pri riešení problémov typu rozoznanie/overenie rodičovských taxónov kríženca, príp. polyploida (GISH), či identifikáciu chromozómov, ktoré vznikli centrickou fúziou. To sú otázky, ktoré som riešila pomocou týchto metód (viď nižšie).

1.3 Ciele práce

Cieľom tejto práce je pomocou štúdia reprodukčných bariér popísať najvýznamnejšie z nich medzi diploidnými a tetraploidnými jedincami *Vicia cracca*. Konkrétne by som rada zodpovedala nasledujúce otázky:

- (1) Je rozdiel v dobe kvitnutia oboch cytotypov?
- (2) Sú nejaké morfologické rozdiely medzi kvetmi cytotypov? Ak áno, dokážu ich opelovači rozoznať?
- (3) Je rozdiel v dennej produkcii a zložení nektáru medzi diploidnými a tetraploidnými kvetmi?
- (4) Tvorí tetraploidy väčšie peľové zrná? Je rozdiel v počte peľových zŕn u rôznych cytotypov?
- (5) Aká je frekvencia vzniku krížencov v potomstve rastlín zo zmiešaných porastov? Aký je význam postreprodukčných bariér medzi cytotypmi?

Druhou časťou mojej práce je skúmanie príbuzenských vzťahov v agregáte *Vicia cracca* agg. Kladiem si 3 otázky:

- (6) Ako vznikla tetraploidná *V. cracca*? Je to autotetraploid diploidnej *V. cracca*, alebo sa na jej vzniku podieľal aj ďalší taxón a je allotetraploid?
- (7) Ako vznikla tetraploidná *V. tenuifolia*? Je allotetraploid, ktorý vznikol krížením *V. dalmatica* a *V. incana* alebo autotetraploid a materským taxónom je iba jeden z uvedených druhov?
- (8) Vznikli *V. dalmatica* a *V. incana* centrickou fúziou dvoch párov chromozómov *V. cracca* s. str. tak, ako sa predpokladá (Rousi 1961)?

Na zodpovedanie otázok (6) a (7) používam GISH (genómovú in situ hybridizáciu), ktorá spočíva v tom, že na chromozómy skúmanej rastliny (v mojom prípade tetraploida) nahybridizujem DNA z predpokladaných rodičovských druhov a skúmam na akú časť genómu sa DNA nahybridizovala. Ak sa nahybridizuje na všetky chromozómy, je predpokladaný rodič jediným rodičom a skúmaná rastlina autotetraploid, ak sa nahybridizuje

iba na polovicu, je skúmaná rastlina allotetraploid. Otázku (8) sa pokúsim zodpovedať pomocou metódy FISH (fluorescenčná in situ hybridizácia). *V. dalmatica* a *V. incana* majú základne chromozómové číslo ($x=6$) o jedno menšie ako *V. cracca* ($x=7$). Preto sa predpokladá, že druhy s menším chromozómovým číslom vznikli centrickou fúziou z *V. cracca*. Pomocou FISH určím chromozómy, ktoré centrifugovali tak, že nahybridizujem telomérové sekvencie na chromozómy *V. dalmatica* a *V. incana* a ak tieto sekvencie budú lokalizované aj inde ako na koncoch chromozómov, vznikli druhy centrickou fúziou.

2 Metodika

2.1 Študovaný taxón

Rod *Vicia* sa vyskytuje v miernom pásme severnej pologule a v trópoch Južnej Ameriky. Najvyššia druhová diverzita je sústredená v stredomorí a na Kaukaze, centrum pôvodného rozšírenia však nie je známy (El-Shanshoury & Soliman 1996). O taxonomické rozčlenenie tohoto rodu sa pred 38 rokmi pokúsila Kupichová (1976). Podľa prítomnosti nektárií a veľkosti súkvetí ho rozdelila na dva podrody *Vicia* L. a *Vicilla* (Schur) Rouy. Druhy s nektáriami na spodnej strane palistov, väčšinou jednokvetými súkvetiami vždy kratšími ako protiľahlý list zaradila do podrodu *Vicia* a druhy bez nektárií, s viackvetými súkvetiami rovnako dlhými alebo presahujúcimi protiľahlý list zaradila do podrodu *Vicilla*. Podrod *Vicia* podľa jej členenia obsahoval 32 druhov v 5 sekciách, podrod *Vicilla* 101 druhov v 17 sekciách. V jej ponímaní je podrod *Vicilla* špecializovanejší (El-Shanshoury & Soliman 1996). Tento koncept je až na malé úpravy, ktoré navrhol Jaaska (2005), zachovaný dodnes, pre podrod *Vicilla* sa však používa názov *Cracca*. V tomto podrode sú obsiahnuté tri štvrtiny celkovej variability rodu. Rozšírenie podrodu *Cracca* je takmer zhodné s rozšírením rodu (Eliášová 2008). Sekcia *Cracca* je druhovo najpočetnejšia sekcia podrodu. Do tejto sekcie patrí aj aglomerát *Vicia cracca* agg., ktorý je predmetom výskumu tejto diplomovej práce. Do tohoto agregátu radíme 5 druhov: diploidné *V. incana* ($2n=12$) a *V. dalmatica* ($2n=12$), tetraploidné *V. tenuifolia* ($2n=24$) a *V. oreophila* ($2n=28$) a druh *Vicia cracca* s. str., ktorý sa vyskytuje v troch cytotypoch: diploidnom ($2n=14$), tetraploidnom ($2n=28$) a vzácné triploidnom ($2n=21$). Všetky vyššie uvedené druhy sú trvalky. *V. cracca* a *V. incana* sú plazivé, ostatné dva druhy nie. *V. cracca* je pôvodná v celej Eurázii, jej súčasné rozšírenie je ale oveľa rozsiahlejšie, keďže bola introdukovaná do Severnej Ameriky, Austrálie a na Nový Zéland. *V. tenuifolia* je rozšírená v Eurázii, južnejšie ako *V. cracca*. Oblasti výskytu *V. incana* sú stredozemné pásmo, západná a stredná Európa, Litva a Ukrajina. *V. dalmatica* sa vyskytuje v Nemecku, západnej, juhovýchodnej a južnej Európe, na Ukrajine a v juhozápadnej a južnej Ázii. *V. oreophila* je najvzácnejšia, vyskytuje sa len lokálne v pohoriach strednej Európy (Eliášová 2008).



Obr. 2 *V. cracca* (foto: autorka)

V. cracca (obr. 2) je vytrvalá popínavá rastlina, ktorá dorastá až do výšky 2 m (web 1, Aarssen 1986). Často tvorí husté porasty. Jasne zelené listy sú perovito zložené z 8-12 párov čiarovitých až úzko podlhovastých lístkov s končistým vrcholom dlhých 5-10 mm a páru úponkov na konci každého listu. Listy sú približne 3-8 cm dlhé. Početné fialové alebo modré bilaterálne symetrické kvety sú relatívne malé (1,5 cm) a nahusto usporiadané v jednostrannom strapci. Kvet má stavbu typickú pre *Fabaceae*: jeden korunný lupienok v tvare striešky, dva postranné v tvare krídel a dva zrastené do člnku. Hoci sa v pokusoch Eliášovej (2008) ukázalo, že *V. cracca* je autokompatibilná, existuje mechanizmus vynucujúci kríženie. Tyčinky sa u čeľade *Fabaceae* otvárajú pred otvorením kvetu a peľ je

uložený na konci člnku okolo vrchnej časti čnelky (Endress 1994). Keď opel'ovač pristáva na člnku, ten sa posunie nadol, aby sa blizna a tyčinky obnažili. Peľ je potom vymetený zo špičky člnku ochlpenou špičkou čnelky. Peľ obklopujúci bliznu však nemôže klíčiť, kým otvorený kvet nie je navštívený opel'ovačom, pretože blizna je pokrytá membránou, ktorá sa naruší až procesom opel'ovania (Endress 1994). Plodom *V. cracca* je plochý 2-3 cm dlhý svetlohnedý struk s malým počtom guľatých tmavých semien, ktorý keď dozrie, praskne do dvoch skrútených polovic. Semená majú 2,5-3,5 mm. Druh sa vyskytuje na otvorených priestranstvách a pozdĺž ciest (web 1, Aarssen 1986).

Rozšírenie cytotypov *V. cracca* v Českej republike, v Nemecku, Rakúsku a na Slovensku skúmali Trávníček *et al.* (2010). Vo voľnej prírode môžeme bežne nájsť tetraploidy a diploidy. V západnej časti skúmaného územia dominujú tetraploidy, vo východnej diploidy. Prechodné územie medzi cytotypmi, na ktorom sa nachádzalo 7% sledovaných populácií, leží na hraniciach Českej a Slovenskej republiky. Rozšírenie cytotypov druhu sa za posledných 40 rokov výrazne nezmenilo. Jedinou zmenou, ktorá bola zaznamenaná, je vyhynutie diplodov v južných Čechách. Triploidný cytotyp je u druhu *Vicia cracca* veľmi vzácny, Eliášová (2008) našla len 8 jedincov vo vzorke 6613 skúmaných jedincov zo 4 krajín. Tento fenomén chcela vysvetliť, preto umelo páрила diploida s tetraploidom, triploidné semená však nevznikli. Z toho vyplýva, že kríženiu medzi cytotypmi bránia silné prezygotické alebo postzygotické bariéry.

2.2 Reprodukčné bariéry

2.2.1 Určovanie úrovne ploidie

Úroveň ploidie bola zisťovaná prietokovou cytometriou. Postupovala som podľa protokolu Galbraith *et al.* (1983) s použitím Ottových pufrov (Otto 1990). Jadrá som uvoľnila sekaním 3 semien alebo 0,5 cm² čerstvého listu *V. cracca* a 0,5 cm² listu *Pisum sativum* (referenčný štandard, 2C=8.76 pg, Greilhuber *et al.* 2007) žiletkou v Petriho miske v 0,5 ml Ottovho pufru I (0,1 M kyseliny octovej, 0,5% Tween 20). Potom som suspenziu prefiltrovala cez nylonové plátno s otvormi 42 µm a nafarbila roztokom obsahujúcim 1 ml Ottovho pufru II (0,4 M Na₂HPO₄), 4 mg.ml⁻¹ DAPI a 2 mg.ml⁻¹ β-merkaptotetanolu. Po piatich minútach inkubácie boli vzorky analyzované v Ploidy analyser II (Partec GmbH, Münster, Germany) so zdrojom svetla HBO UV mercury arc lamp s excitačným žiarením v UV spektre. Fluorescencia minimálne 3000 jadier bola analyzovaná programom FloMax (v. 2.4d, Partec GmbH).

2.2.2 Fenologická izolácia

Pre sledovanie fenológie som sa inšpirovala metodikou v článku Jersákovéj *et al.* (2010). Za účelom určenia miery prekryvu doby kvitnutia diploidného a tetraploidného cytotypu som pozorovala jedince so známou ploidiou pestované v botanickej záhrade Prírodovedeckej fakulty Univerity Karlovej v Prahe. Zaznamenávala som pre každú rastlinu počet súkvetí v štádiu pukov, kvitnúcich súkvetí a čerstvo odkvitnutých súkvetí. Rastliny som pozorovala od 14. júna 2013 do 2. augusta 2013 2-krát týždenne.

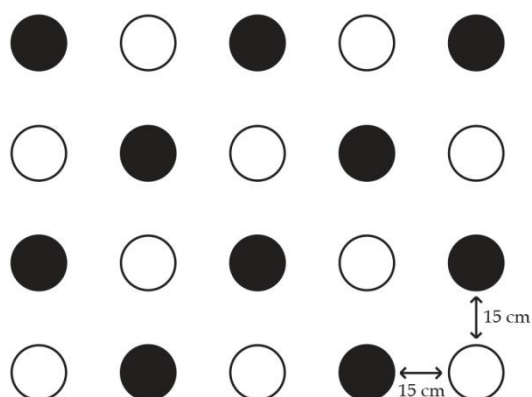
2.2.3 Správanie opel'ovačov

Opel'ovače boli pozorované vo vegetačných sezónach v rokoch 2013 a 2014 v Průhoniciach (Stredočeský kraj, Česká republika), kde sa prirodzene vyskytuje tetraploidný cytotyp a vo vegetačnej sezóne v roku 2014 na Budči (Banskobystrický kraj, Slovenská republika), kde sa prirodzene vyskytujú prevažne diploidy, v 6,5 km vzdialenom Trní bola nájdená aj lokalita so zmiešanou populáciou diploidov a tetraploidov (Eliášová 2008). V roku 2013 som náhodne rozmiestnila 10 diploidov a 14 tetraploidov, v roku 2014 boli kvetinače rozmiestnené podľa schémy znázornenej na obr. č. 4. V roku 2013 prebiehali pozorovania 5 dní v doobedných hodinách v období medzi 28. 6. a 10. 7. Leto v roku 2013 bolo extrémne horúce a keďže som premiestňovala črepníky s pozorovanými vikami,



Obr. 3 Súmračník hrdzavý, *Ochlodes sylvanus* (foto: autorka)

ktorých korene boli vrastené do zeme pod črepníkom, rastliny prišli o časť koreňov a už po prvom týždni začali vysychať. Preto boli pozorovania 10. 7. ukončené. Na Budči v roku 2014 boli opeľovače pozorované 21. 6. poobede a od 22. 6. do 25. 6. celé dni. V Prúhonicach v roku 2014 prebiehali pozorovania od 14. 7. do 17. 7. prevažne v dopoludňajších hodinách,



Obr. 4 Schéma rozmiestnenia kvetináčov s jedincami *V. cracca* rôznej ploidie: prázdne koliesko, diploid; plné koliesko, tetraploid.

15. 7. až do 13:30. Vždy bol zaznamenaný typ opel'ovača, čas kedy priletel na prvý kvet, sekvencia rastlín, ktoré navštívil a ku každej navštívenej rastline počet opelených kvetov.



Obr. 5 Pieskárka, *Andrena* sp. (foto: autorka)

2.2.4 Analýza semien zo zmiešanej populácie

Za účelom zistenia takmer celkovej miery reprodukčnej izolovanosti (okrem priestorovej) som analyzovala semená z umelej zmiešanej diploidno-tetraploidnej populácie *V. cracca*, ktorú založila Anežka Eliášová v Ostrave. Rastliny v tejto populácii boli vypestované zo semien, ktoré Eliášová zozbierala na lokalitách prirodzeného výskytu druhu. Rastliny pestované vo vegetačnej sezóne 2008 pochádzali z 21 lokalít, z ktorých bolo 9 diploidných, 8 tetraploidných a 3 zmiešané. Vo vegetačnej sezóne 2011 pochádzali rastliny z piatich zmiešaných populácií. Vybrala som 20 diploidných a 20 tetraploidných rastlín (zoznamy vybraných rastlín sú v tabuľkách č. 1 a 2) z každej z dvoch vegetačných sezón (2008 a 2011), desať semien každej z týchto rastlín som zmerala na cytometri a ďalších desať nechala naklíčiť v rastovej komore (cyklus 12 hod 7°C, 12 hod 20°C). Pred klíčením som semená asi 5 minút brúsila šmirgl'ovým papierom, aby som imitovala mechanické narušenie v prírode. Po šiestich týždňoch som zmerala ploidiu semenáčikov, ktoré vykličili. Ploidiu semien aj semenáčikov z vegetačnej sezóny 2008 som merala v Botanickom ústave

v Průhoniciach 6. 2. 2012. Ploidiu semien z vegetačnej sezóny 2011 som merala na Univerzite v Innsbrucku v máji 2013 a ploidiu semenáčikov z tejto sezóny som určila v Průhoniciach 21. 6. 2013.

Tabuľka 1 Kódy a ploidia materských rastlín zo zmiešanej populácie v Ostrave z vegetačnej sezóny 2008, prvé číslo v kóde rastliny označuje populáciu, z ktorej pochádza

kód rastliny	ploidia	kód rastliny	ploidia	kód rastliny	ploidia
10_4	2	301_8B	2	59_11	4
10_11	4	301_9A	2	59_13	4
10_12	2	301_9B	2	59_16	4
10_13	2	303_1	2	59_17	4
10_15	2	303_3	2	59_17B	4
10_17	2	303_5	2	59_18	4
10_25	2	34_4	2	59_19	4
10_27	2	34_6	2	59_6	4
10_28	2	34_7	2	59_9	4
10_6	2	36_3	4	88_4B	4
10_7	2	43_2	4	M2	4
15_1	4	45_1	4	M3	4
301_8A	2	46_1	4	M4	4
				M5	4

Tabuľka 2 Kódy a ploidia materských rastlín zo zmiešanej populácie v Ostrave z vegetačnej sezóny 2011, prvé 3 písmená v kóde rastliny označuje populáciu, z ktorej pochádza

kód rastliny	ploidia	kód rastliny	ploidia	kód rastliny	ploidia
Mach17Z	2	Mak4N	4	Svr31N	4
Mach22Z	2	Mak4Z	4	Svr43Z	4
Mach33Z	2	Rak19N	4	Svr44Z	4
Mach39Z	2	Rak19Z	4	Vys11Z	2
Mak14N	4	Rak23Z	2	Vys17Z	2
Mak14Z	4	Rak24Z	4	Vys1Z	2
Mak19Z	4	Rak26Z	4	Vys25Z	2
Mak25Z	2	Rak27Z	2	Vys33N	4
Mak27Z	2	Rak32N	2	Vys33Z	4
Mak29N	2	Rak32Z	2	Vys36N	4
Mak31Z	2	Rak7Z	2	Vys36Z	4
Mak33Z	2	Svr12Z	4	Vys37Z	4
Mak36Z	4	Svr19Z	4	Vys38Z	4
				Vys4Z	2

2.2.5 Produkcia a zloženie nektáru

Kvety, ktorých produkciu nektáru som skúmala, som jeden deň zabalila do nylonového vrecúška a na druhý deň alebo na tretí deň v tom istom čase odobrala mikropilárnou pipetou nektár. Takto som zistila produkciu nektáru za deň (príp. dva dni). Produkciu nektáru som merala u diploidov a tetraploidov, na každej rastline vždy v troch kvetoch. 26. júna 2014 som merala 2-dňovú produkciu nektáru na dvoch diploidných a dvoch tetraploidných rastlinách a 1-dňovú na dvoch tetraploidných rastlinách. 5. júla 2014 som merala 1-dňovú produkciu nektáru na desiatich diploidných a siedmich tetraploidných rastlinách. Prípadný rozdiel v produkcii nektáru by mohol vysvetliť správanie opel'ovačov.

2.2.6 Veľkosť peľových zŕn a ich množstvo

Zo štyroch diploidných a štyroch tetraploidných jedincov z rôznych populácií som odobrala po jednom súkvetí a našla na ňom pod lupou OLYMPUS S261 dva vhodné kvety, tj. také, ktorých peľnice ešte neboli rozpuknuté, ale už v nich bol vyvinutý peľ. Boli to puky tesne pred rozkvitnutím. Z týchto kvetov som odstránila korunné lupienky a z každého kvetu som odobrala niekoľko peľníc (dve až päť) a tie som jednotlivo umiestnila na podložné sklíčka. Následne som pridala kvapku fuchsínu a nechala 10 minút pôsobiť. Keď boli peľové zrná nafarbené, položila som na preparát krycie sklíčko a roztlačila peľnicu poťukaním ihly. Na takto pripravených preparátoch som spočítala peľové zrná pod mikroskopom OLYMPUS BX 53 pri 200-násobnom zväčšení. Podobne som pripravila preparáty na meranie veľkosti peľových zŕn, použila som však kvitnúce kvety, v ktorých je peľ už zrelý a má teda maximálnu veľkosť. Pri príprave jedného sklíčka som použila viac peľníc z jedného kvetu. U 15 peľových zŕn z každého kvetu som odmerala najmenší a najväčší priemer.

2.2.7 Umelé kríženie

Opel'ovala som diploidy a tetraploidy v rámci ploidií tak, že som krížila vždy rastliny z rôznych populácií a robila som aj medzicytotypové kríženie. Súkvetia sa v čase, keď sú ešte kvety v štádiu pukov, zabalila do nylonových vrecúšok, aby sa zabránilo prístupu opel'ovačov. V deň opel'ovania sa odstránili vrecúška zo súkvetí, ktoré mali byť vzájomne opelené a zo súkvetí sa odstránili všetky kvety okrem piatich práve kvitnúcich. Počet odstránených kvetov bol zaznamenaný. Z piatich kvetov bola kvôli lepšiemu prístupu k pohlavným častiam kvetu odstránená striedka (najväčší korunný lupienok). Potom bol na každý z dvoch štetcov nabratý peľ z prvej dvojice kvetov a následne nanosený na bliznu druhého kvetu. To sa zopakovalo s ďalšími štyrmi dvojicami kvetov a štetcov. Opelené kvety

boli znovu zabalené do nylonových vrecúšok až do doby, kým sa nevyvinuli plody. Tie boli zozbierané a ich ploidia určená pomocou prietokovej cytometrie. Umelé opeľovanie som robila 12. a 13. júna 2014. Jednotlivé kríženia sú zaznamenané v tabuľke č. 3.

Tabuľka 3 Umelé opeľovanie rastliny 1 a rastliny 2, ploidia 1 a 2- ploidia rastliny 1 a 2, odstr. kv. 1 a 2- počet odstránených kvetov z opeľovaného súkvetia nad (h) a pod (d) opeľovanými kvetmi

dátum	rastlina 1	ploidia 1	odstr. kv. 1	rastlina 2	ploidia 2	odstr. kv. 2
12. 6.	4VCN 2/2/3	4	11h+12d	2VC3/8/3	2	1h+12d
12. 6.	4VCN 2/2/3	4	11h+13d	2VC2/4/3	2	4h+22d
12. 6.	4VCN 2/2/3	4	32h+13d	4VCN1/6/3	4	9h+14d
12. 6.	2VC2/2/1	2	33h+17d	2VC4/1/3	2	11h+22d
12. 6.	2VC2/2/1	2	13h+16d	2VC5/7/1	2	26h+7d
12. 6.	2VC4/6/1	2	25h+21d	4VCN2/2/3	4	10h+19d
13. 6.	2VC3/8/2	2	62h	2VC2/4/3	2	8h+27d
13. 6.	2VC2/4/1	2	35h+2d	2VC4/4/1	2	12h+20d

2.3 In situ hybridizácia

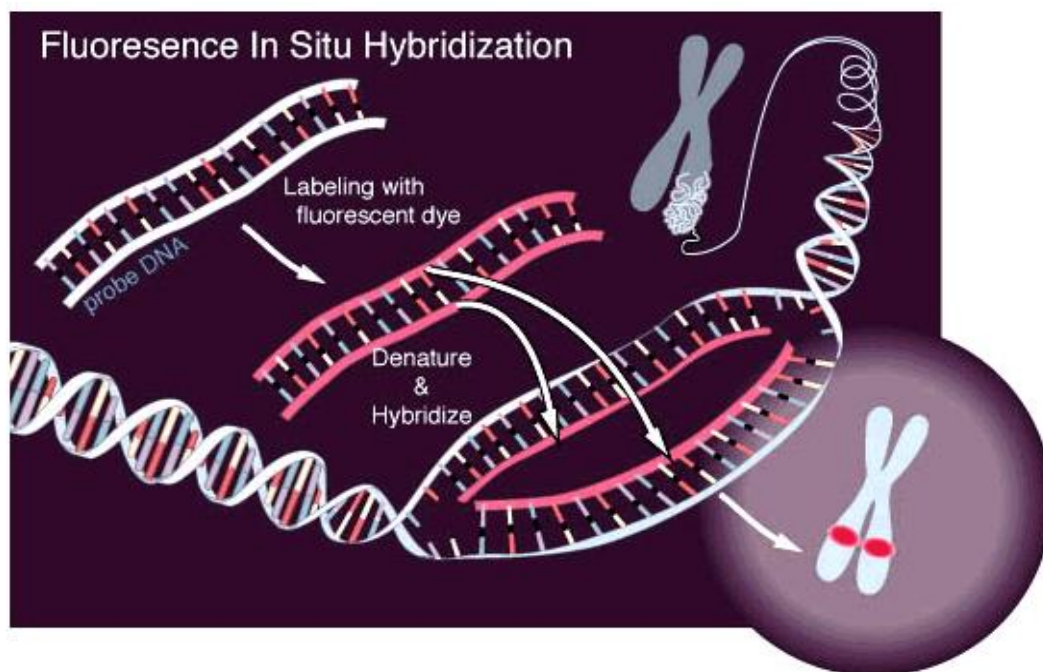
Pred samotnou in situ hybridizáciou je potrebné pripraviť cieľový materiál a sondu (princíp metódy je graficky znázornený na obr. 6). Sonda je úsek DNA alebo RNA označený (v mojom prípade fluorescenčným farbivom), aby sa dalo detekovať miesto jeho hybridizácie na cieľovú DNA/RNA. Sonda sa pripravuje z DNA vyizolovanej z materiálu, ktorého DNA chceme hybridizovať. DNA som izolovala z rastlín uvedených v tabuľke č. 4 pestovaných v skleníku v Průhoniciach. Semená rastlín som získala zo semennej banky.

Tabuľka 4 Rastliny, z ktorých bola izolovaná DNA na prípravu sond

Kód rastliny	druh
11/10	<i>Vicia cracca</i> (2x)
VC34	<i>Vicia cracca</i> (2x)
VC29	<i>Vicia incana</i>
VC30	<i>Vicia dalmatica</i>
VC35	<i>Vicia dalmatica</i>
VC33	<i>Vicia tenuifolia</i>
VC36	<i>Vicia tenuifolia</i>
VC36	<i>Vicia tenuifolia</i>

Podľa protokolu "Príprava sondy" (viď Príloha A) si na DNA sondy naviažem biotín a digoxigenín, na ktoré sa neskôr prostredníctvom protilátok naviažu fluorescenčné farbivá. Ďalším krokom je príprava chromozómových roztlakov (detailnejšie viď Príloha A). Končeky mladých koreňov sa odoberajú doobeda, kedy korene najintenzívnejšie rastú. Končeky koreňov sedem dní fixujem a následne farbím acetokarmínom. Nasleduje samotný roztlak na vyleštenom sklíčku (Masoudi-Nejad *et al.* 2002, Loureiro *et al.* 2007). Z korienku odrežem asi ½ mm meristému a roztláčim v kvapke 45 %-nej kyseliny octovej. Zahrejem nad plameňom kahanu a poriadne pritlačím krycie sklíčko. Sklá zmrazím na suchom ľade, odstránim krycie sklíčko a vložím do 45 %-nej kyseliny octovej. Vyberiem, nechám usušiť. Takto pripravené preparáty sa môžu použiť na hybridizáciu, najskôr sa však kvalita chromozómov musí skontrolovať pod svetelným mikroskopom. Je dôležité, aby boli chromozómy mimo bunku, aby sa k nim dostala sonda. Chromozómy musia byť úplne špiralizované a dostatočne rozprestrené do plochy, aby bol výsledný obraz s nahybridizovanou sondou prehľadný. Po výbere vhodných skiel, môžeme pristúpiť k hybridizácii. Najskôr si určím stringenciu (minimálnu mieru compatibility DNA reťazca cieľového materiálu a sondy, pri ktorej bude dvojzávitnica stabilná) a podľa toho pripravím

hybridizačný roztok a z neho pridaním vody a sondy (jednej alebo viacerých) vytvorím hybridizačnú zmes (viď Príloha A), ktorú napipetujeme na sklá s roztláčenými chromozómami a sklá prikryjem krycími sklíčkami. Zahriatím na 80°C denaturujem DNA.



Obr. 6 Grafické zobrazenie princípu metódy FISH (probe- sonda, labeling with fluorescent dye- značenie flouorescenčným farbivom, denature & hybridize- denaturovanie a hybridizácia; web 2)

Následne nechám 16 hodín hybridizovať v inkubátore pri teplote 37°C. Na druhý deň zmyjem krycie sklíčka destilovanou vodou a ponorením do 2xSSC odstránim dextran. Premyjem destilovanou vodou a usuším. Na sklíčko nanesiem detekčný roztok s protilátkami k biotínu a digoxigenínu s naviazaným fluorescenčným farbivom. Prikryté krycím sklíčkom nechám hodinu inkubovať pri 37°C (aby sa protilátky mali čas naviazať na sondu). Zmyjem krycie sklíčko, premyjem vodou, usuším a konzervujem v uzatváracom médiu Vectashiled (Vector Laboratories, USA). Použila som koreňky, ktoré som odobrala z rastlín pestovaných v skleníku v Botanickom ústave v Průhoniciach.

2.4 Analýza dát

2.4.1 Fenologická izolácia

Podľa Husband & Schemske (2000) som vypočítala koeficient prekryvu kvitnutia cytotypov a graficky znázornila fenológiu cytotypov. Aby som graficky znázornila krivky kvitnutia, vyjadrila som počet kvitnúcich kvetov na cytotyp počas jedného pozorovania ako percento z maximálneho počtu kvitnúcich kvetov v jedno pozorovanie na cytotype. Koeficient prekryvu kvitnutia som spočítala tak, že som si najskôr pre každé pozorovanie a pre oba cytotypy vyjadrila počet kvitnúcich kvetov daného cytotypu ako percento zo všetkých kvetov tohto cytotypu kvitnúcich naprieč všetkými pozorovaniami. Potom som vzala pre každé pozorovanie hodnotu toho cytotypu, ktorý mal nižšie percento kvitnúcich kvetov a tieto hodnoty som sčítala. Tento koeficient, ktorý vyjadruje časť krivky kvitnutia, ktorá sa prekrýva, sa rovná nule, keď je kvitnutie úplne asynchrónne a jednotke, keď sa kvitnutie úplne prekrýva.

2.4.2 Správanie opel'ovačov

Jednotlivé pozorovania som pre lepšiu orientáciu označila "Průhonice 1" (pozorovania v roku 2013), "Průhonice 2" (pozorovania v roku 2014) a "Budča". Výsledky každého z týchto pozorovaní boli analyzované zvlášť. Prvou štatistickou analýzou som zisťovala, či sú opel'ovače verné plodii (či ak opel'ovali napr. diploida, preleteli potom znovu na diploida). Najskôr som pomocou kontingenčnej tabuľky v programe Microsoft Excel 2007 vypísala pre každé z 3 pozorovaní koľko bolo zaznamenaných preletov medzi jednotlivými plodiami. Potom som v programe Statistica (ver. 7) Yatesovým korigovaným Chi-kvadrát testom a Fisherovým presným jednostranným testom testovala hypotézu H_{01} : Opel'ovače si vyberajú kvety čo sa týka ploidie náhodne.

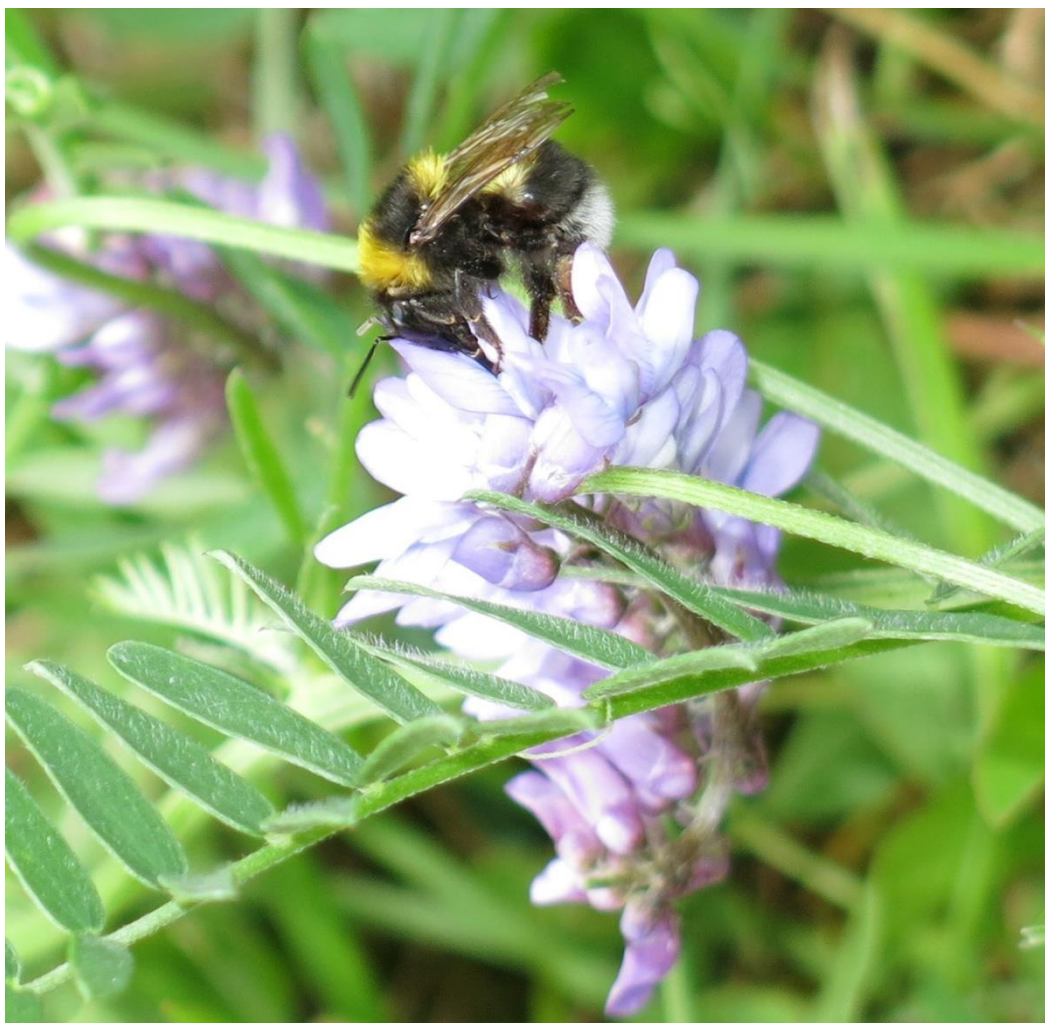
Ďalším testom som zisťovala pre každé pozorovanie, či z niektorého cytotypu častejšie odletel opel'ovač preč z pozorovaného záhonu oproti náhodnému správaniu. Znovu som použila kontingenčnú tabuľku (Microsoft Excel 2007), do ktorej som vypísala počty letov z diploida na ďalšiu rastlinu, z diploida von zo záhonu a rovnako pre tetraploidov. Následne som Yatesovým korigovaným Chi-kvadrát testom testovala hypotézu H_{02} , že sa opel'ovače, čo sa týka preletov a odletov správali náhodne. Týmto testom môžem zistiť (ak by som hypotézu H_{02} zamietla), že niektorý cytotyp je atraktívnejší, a preto po jeho návšteve

ostane opel'ovač na záhone so signifikantne väčšou pravdepodobnosťou ako keď navštívi druhý cytotyp.



Obr. 7 Čmeľ *Bombus pascuorum* (foto: autorka)

Ďalšia zaujímavá otázka, je či sú diploidné alebo tetraploidné rastliny navštevované signifikantne častejšie a či je priemerný počet navštívených kvetov u jednej ploidie výrazne vyšší. Stanovila som si dve hypotézy H_{03} : Obidve ploidie sú navštevované rovnako často; a H_{04} : Priemerný počet navštívených kvetov pri jednej návšteve opel'ovača nie je závislý na ploidii. Pomocou kontingenčnej tabuľky (Microsoft Excel 2007) som si vypísala pre každú rastlinu v rámci každého z troch pozorovaní počet návštev a priemerný počet navštívených kvetov a potom som v programe R (ver. 3.1.1.) robila zobecnený lineárny model (GLM) oboch veličín v závislosti na ploidii. Pre počet návštev som použila Poissonove rozdelenie a pre priemerný počet kvetov Gamma rozdelenie.



Obr. 8 Čmel' *Bombus lucorum* (foto: autorka)

Ďalšia otázka, na ktorú sa môžeme s takto zozbieranými dátami pýtať je, či jednotlivé druhy opel'ovačov preferujú niektorý z cytotypov *V. cracca*. Stanovila som si hypotézu H0₅: Testovný druh opel'ovača nemá žiadnu preferenciu voči ploidii. Do kontingenčnej tabuľky (Microsoft Excel 2007) som pre 2 pozorovania (Prŕhonice 2 a Budča) vypísala pre každý druh opel'ovača pozorovaný počet návštev diploidných a tetraploidných rastlín. Potom som si vypočítala očakávané hodnoty a Chí-kvadrát testom testovala pre každý druh opel'ovača hypotézu H0₅.

Posledná otázka, ktorú sa na základe dát z pozorovania opel'ovačov pokúsim zodpovedať, je či niektorý druh opel'ovača preferuje jeden z cytotypov. Hypotéza H0₆ predpokladá, že každý opel'ovač si vyberá opel'ovanú rastlinu náhodne. Túto hypotézu som testovala na dátach z pozorovaní "Prŕhonice 2" a "Budča". Pomocou kontingenčnej tabuľky (Microsoft Excel 2007) som si vypísala pre každého opel'ovača počet návštev na



Obr. 9 Čmel' *Bombus humilis* (foto: autorka)

diploidných a tetraploidných rastlinách. Potom som vypočítala očakávaný počet návštev a Chí-kvadrát testom testovala, či sa očakávané a pozorované hodnoty líšia.

2.4.3 Produkcia nektáru

Výsledky meraní jednoduchovej a dvojdnovej produkcie som analyzovala každé zvlášť. Podľa hyotézy H_{07} by sa produkcia (jednodňová aj dvojdnová) nektáru diploidov a tetraploidov nelíšila. Túto hypotézu som testovala v programe R (ver. ver. 3.1.1. © 2014) pomocou zobecneneého lineárneho modelu (GLM) oboch veličín v závislosti na ploidii. Použila som Gamma rozdelenie.



Obr. 10 Modráčik čiernoškvrnný, *Phengaris arion* (foto: autorka)

2.4.4 Veľkosť peľových zŕn a ich množstvo

Veľkosť peľových zŕn je charakterizovaná dvoma odmeranými veličinami (dĺžka a šírka, resp. najdlhší a najkratší priemer) a jednou vypočítanou – plošný obsah elipsy ($S=ab\pi$). Hypotéza H_{08} , ktorú som testovala v programe R (ver. 3.1.1.) zobecneným lineárnym modelom, znie: Veličiny dĺžka, šírka a obsah peľového zrna nie sú závislé na ploidii. Použila som normálne rozdelenie. Hypotézu H_{09} (počet peľových zŕn v jednej peľnici je nezávislý na ploidii) som tiež testovala v programe R (ver. ver. 3.1.1.) zobecneným lineárnym modelom, použila som však Poissonovo rozdelenie.



Obr. 11 Mlynárik repový, *Pieris rapae* (foto: autorka)

2.4.5 Zložky reprodukčnej izolácie

Podľa Husband & Sabara (2003) som vypočítala koeficienty reprodukčnej izolácie:

- priestorovej $RI_{\text{geogr}} = 1 - \frac{\text{počet zmiešaných dipl.-tetrapl. populácií}}{\text{počet všetkých populácií}}$,
- časovej $RI_{\text{phen}} = 1 - \frac{\text{počet dní spoločného kvitnutia}}{\text{počet všetkých dní, kedy kvitli}}$
- zapríčinennej správaním opel'ovačov
 $RI_{\text{pollinator}} = 1 - \frac{\text{počet preletov medzi ploidiami}}{\text{počet všetkých preletov}}.$

Podľa Ramsey *et al.* (2003) som vypočítala koeficient celkovej reprodukčnej izolácie $RI_{\text{total}} = \sum_{i=1}^n AC_i$, kde $AC_n = RI_n (1 - \sum_{i=1}^{n-1} AC_i)$.

3 Výsledky

3.1 Reprodukčné bariéry

3.1.1 Analýza semien a semenáčikov zo zmiešanej populácie

Výsledky analýz ploidie sú uvedené v tabuľkách č. 5 a 6.

Tabuľka 5 Výsledky merania ploidie semien zo zmiešanej populácie diploidnej a tetraploidnej *V. cracca* získané metódou prietokovej cytometrie

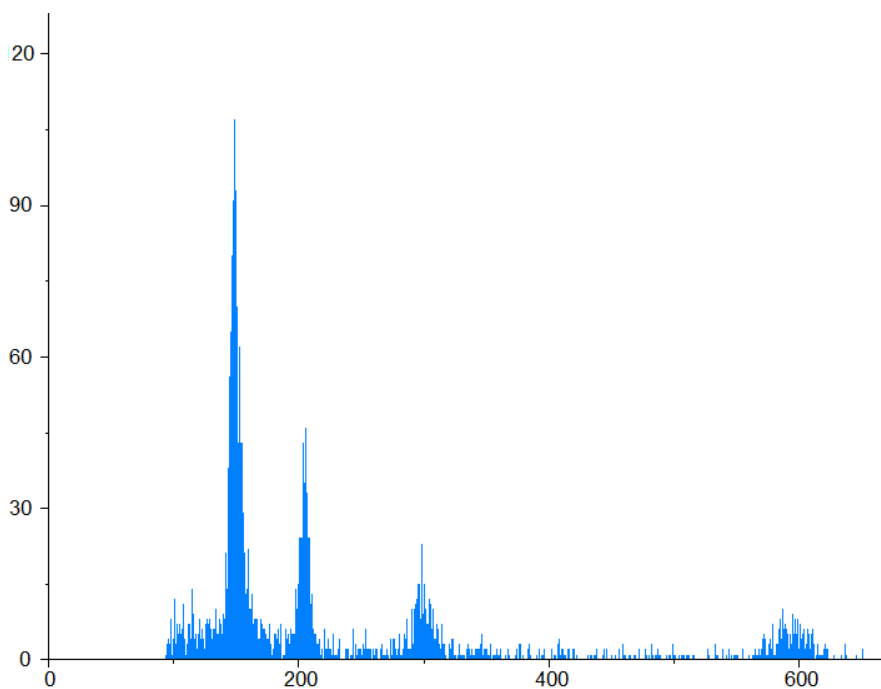
Ploidia materskej rastliny	Počet rastlín	Celkový počet skúmaných semien	Ploidia semien
Vegetačná sezóna 2009			
diploid	20	180	diploidy: 180
tetraploid	20	180	tetraploidy: 179 aneuploid: 1
Vegetačná sezóna 2011			
Diploid	20	200	diploidy: 200
Tetraploid	20	200	tetraploidy: 197 aneuploidy: 3

Tabuľka 6 Výsledky merania ploidie semenáčikov zo zmiešanej populácie diploidnej a tetraploidnej *V. cracca* získané metódou prietokovej cytometrie

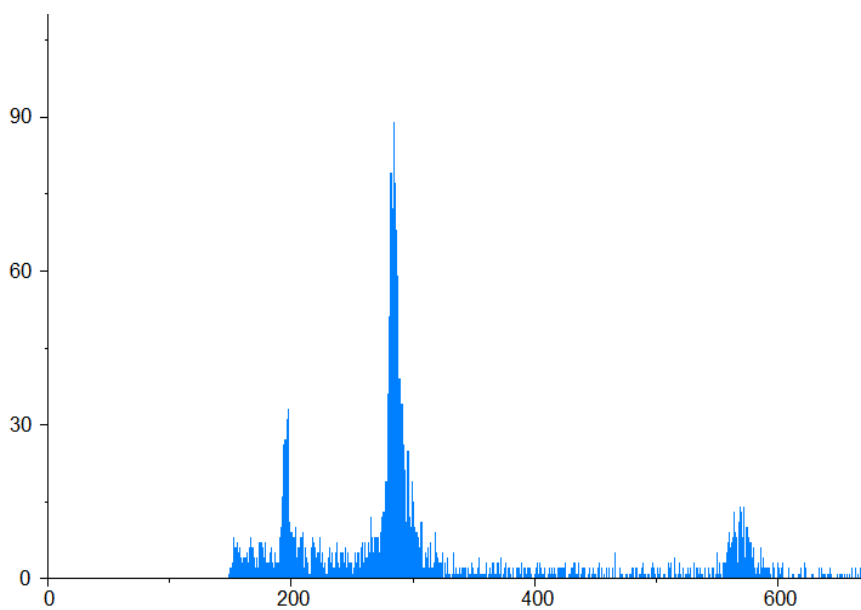
Ploidia materskej rastliny	Počet rastlín	Počet vyklíčených semenáčikov	Ploidia semenáčikov
Vegetačná sezóna 2009			
Diploid	20	145	diploidy: 145
tetraploid	16 *	74	tetraploidy: 72 aneuploidy: 2
Vegetačná sezóna 2011			
Diploid	20	107	diploidy: 99 tetraploidné: 8
Tetraploid	20	164	tetraploidy: 163 aneuploidy: 1

*od 4 materských rastlín žiadne semeno nevyklíčilo

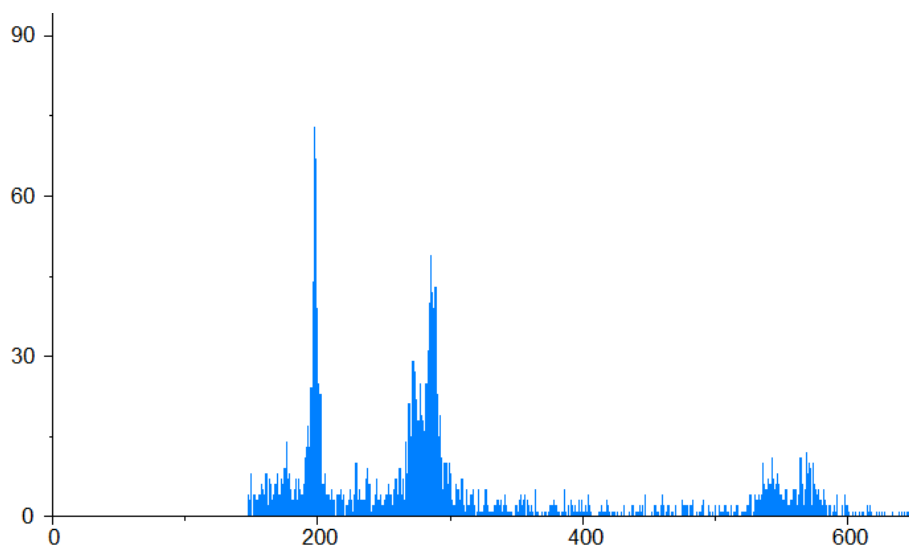
Na obrázkoch č. 12, 13 a 14 sú výstupné grafy z programu Flomax (ver. 2.4d) zobrazujúce diploida, tetraploida a aneuploida so štandardom *Pisum sativum* na hodnote 200.



Obr. 12 Analýza semien diploidnej *V. cracca*



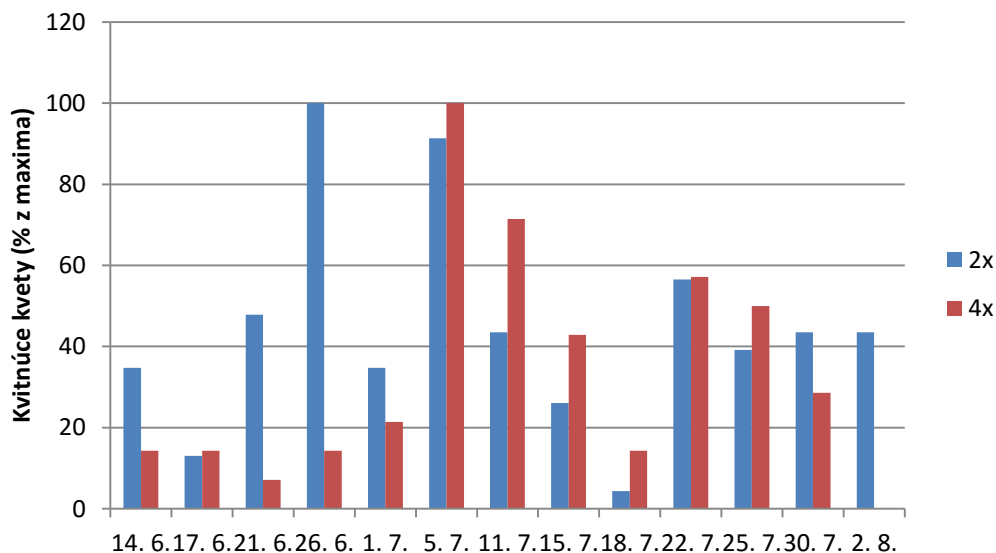
Obr. 13 Analýza semien tetraploidnej *V. cracca*



Obr. 14 Analýza semien tetraploidnej a aneuploidnej *V. cracca*

3.1.2 Fenologická izolácia

Koeficient prekryvu kvitnutia diploidov a tetraploidov je 64%. Fenológia je znázornená na grafe č. 1. Diploidy a tetraploidy začali kvitnúť spolu, ale maximum otvorených kvetov je u tetraploidov o 9 dní neskôr ako u diploidov. Diploidy kvitli o jedno pozorovanie dlhšie.



Graf 1 Fenológia kvitnutia diploidov (modré stĺpce) a tetraploidov (červené stĺpce) na základe pozorovaní zmiešanej populácie *Vicia cracca* dva krát týždenne v kontrolovaných záhradných podmienkach. Počet kvitnúcich kvetov každý pozorovaný deň je vyjadrený ako percentuálna časť z maximálneho počtu kvetov kvitnúcich pri jednom pozorovaní (pre diploidy to bolo 26. 6., pre tetraploidy 5. 7.).

3.1.3 Priestorová izolácia

Eliášová (2008) určila ploidiu celkovo u 6 613 rastlín z 261 populácií. 180 populácií (68,96 %) bolo tetraploidných a 61 populácií (23,37 %) bolo diploidných. 18 populácií (6,9 %) pozostávalo z jedincov oboch ploidí. V ďalších dvoch diploidných populáciách (0,77 %) bolo nájdených 8 triploidov. Koeficient priestorovej izolácie je podľa týchto dát $RI_{\text{geogr}}=0,931$.

3.1.4 Správanie opeľovačov

Hypotézu H_{01} : Opeľovače si vyberajú kvety čo sa týka ploidie náhodne. zamietam na hladine významnosti $p < 0.05$ v oboch pozorovaniach, ktoré prebehli v roku 2014 na základe výsledkov Yatesovho korigovaného Chí-kvadrát testu (viď tabuľka č. 9). V žiadnom prípade sa avšak nepodarilo potvrdiť alternatívnu hypotézu, tj. že opeľovače preferenčne preletujú medzi rastlinami rovnakej ploidie. Z kontingenčných tabuliek (tabuľka č. 7 a 8) totiž vidíme, že v týchto dvoch prípadoch (Prúhonice 2 a Budča) signifikantne viac opeľovačov prelietavalo medzi rastlinami rôznych ploidí ako v rámci ploidie. Pre pozorovanie "Prúhonice 1" nebol ani jeden test signifikantný, čo znamená že som neobjavila žiadny "pattern", podľa ktorého si opeľovače vyberajú cytotyp ďalšej navštívenej rastliny.

Tabuľka 7 Kontingenčná tabuľka pre lokalitu Prúhonice 2 ukazuje výrazne vyšší počet preletov medzi ploidiami na vedľajšej diagonále ako v rámci ploidie

Selekcia cytotypov	Ploidia východzej rastliny		Celkový súčet
Ploidia cieľovej rastliny	2x	4x	
2x	49	102	151
4x	94	58	152
Celkový súčet	143	160	303

Tabuľka 8 Kontingenčná tabuľka pre lokalitu Budča ukazuje výrazne vyšší počet preletov medzi ploidiami na vedľajšej diagonále ako v rámci ploidie

Selekcia cytotypov	Ploidia východzej rastliny		Celkový súčet
Ploidia cieľovej rastliny	2x	4x	
2x	127	288	415
4x	294	126	420
Celkový súčet	421	414	835

Tabuľka 9 Výsledky testov selekcie cytotypov, hodnoty označené hviezdikami sú signifikantné

Selekcia cytotypov		
Test	Yatesov kor. Chi-kvadrat	p hodnota
Lokalita		
Průhonice 1	0.62	0.4304
Průhonice 2	25.09	< 0.001***
Budča	128.04	< 0.001***

Na základe testovania odletov a preletov sa nedá povedať, že by bol niektorý cytotyp atraktívnejší pre opel'ovače tak, že by ich inšpiroval zostať na záhone namiesto toho, aby odletel. Ani na jednej lokalite ani v jednej sezóne nebol použitý Yatesov korigovaný Chi-kvadrat test signifikantný (viď tabuľka č. 10).

Tabuľka 10 Výsledky testov atraktivity cytotypu pre jednotlivé pozorovania

Atraktivita cytotypu		
Test	Yatesov kor. Chi-kvadrat	p hodnota
Lokalita		
Průhonice 1	0.13	0.7173
Průhonice 2	0.12	0.7297
Budča	2.51	0.1129

Hypotézy H0₃: Obidve ploidie sú navštevované rovnako často. A H0₄: Priemerný počet navštívených kvetov pri jednej návšteve opel'ovača nie je závislý na ploidii. Nemožno zamietnuť ani pre jedno pozorovanie (viď tabuľka č. 11). Opel'ovače sa teda z celkového pohľadu nesprávali výrazne inak ako náhodne.

Tabuľka 11 Výsledky ANOVY testujúcej vplyv ploidie na počet návštev na rastline a na priemerný počet navštívených kvetov

Pozorovanie	Testovaná veličina	Deviance	Resid. Df	P(> Chi)
Průhonice 1	počet návštev na rastline	3,063	21	p= 0,08000
Průhonice 1	priemerný počet navštívených kvetov	0,3472	21	p= 0,28440
Průhonice 2	počet návštev na rastline	1,942	16	p= 0,16300
Průhonice 2	priemerný počet navštívených kvetov	0,08475	16	p= 0,47053
Budča	počet návštev na rastline	0,13	19	p= 0,72000
Budča	priemerný počet navštívených kvetov	0,0208	19	p= 0,76730

Signifikatne sa oproti očakávaným hodnotám líši správanie dvoch druhov na lokalite „Budča“: čmeľa *Bombus pascuorum* a pieskárky *Andrena* (vid' tab. 12). Čmeľ navštevuje častejšie tetraploidné rastliny a pieskárka diploidné. Na lokalite „Průhonice 2“ sa správali jednotlivé druhy opel'ovačov náhodne (vid' tab. 13).

Tabuľka 12 Výsledky Chí-kvadrát testu testujúceho rozdiel v počte návštev rastlín medzi diploidnými a tetraploidnými rastlinami pre jednotlivých opel'ovačov na lokalite Budča (pozorovaný počet návštev diploidov – o2 a tetraploidov – o4, očakávaný počet návštev diploidov- e2 a tetraploidov- e4)

Opel'ovač	o2	o4	e2	e4	p(chi)
<i>Bombus pascuorum</i> (obr. 7)	148	186	173.162916	160.83708	0.005859**
<i>B. lucorum</i> (obr. 8)	37	37	38.3654365	35.634563	0.750732
<i>B. humilis</i> (obr. 9)	7	8	7.77677768	7.2232223	0.688126
<i>Hymenoptera</i>	2	2	2.07380738	1.9261926	0.941124
<i>Phengaris arion</i> (obr. 10)	9	8	8.81368137	8.1863186	0.927938
<i>Ochlodes sylvanus</i> (obr. 3)	4	4	4.14761476	3.8523852	0.916812
<i>Pieris rapae</i> (obr. 11)	4	2	3.11071107	2.8892889	0.467473
<i>Andrena</i> sp. (obr. 5)	365	288	338.549055	314.45095	0.038301*

Tabuľka 13 Výsledky Chí-kvadrát testu testujúceho rozdiel v počte návštev rastlín medzi diploidnými a tetraploidnými rastlinami pre jednotlivých opel'ovačov na lokalite Průhonice 2 (pozorovaný počet návštev diploidov – o2 a tetraploidov – o4, očakávaný počet návštev diploidov- e2 a tetraploidov- e4)

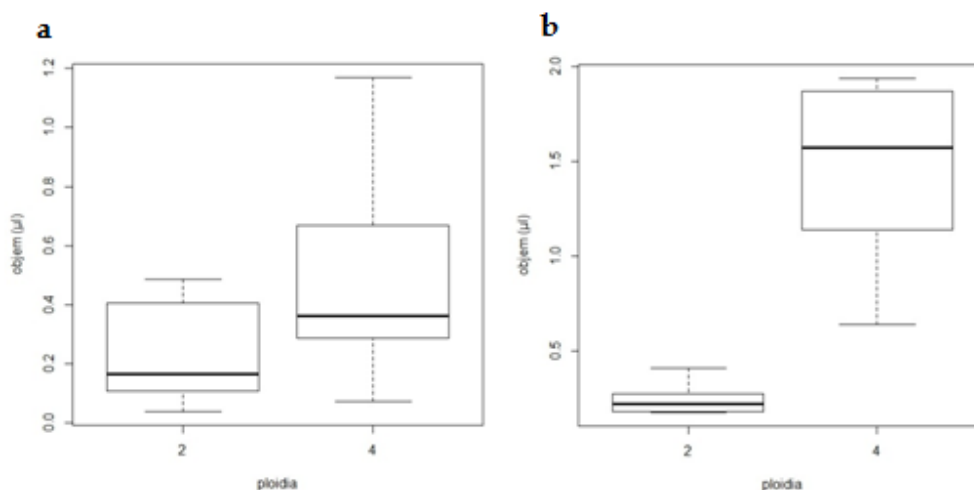
Opel'ovač	e2	e4	o2	o4	p(chi)
<i>Lepidoptera</i> 1.	0	1	0.465347	0.534653	0.524506
<i>Hymenoptera</i> 1	0	1	0.465347	0.534653	0.524506
<i>Hymenoptera</i> 2	1	0	0.465347	0.534653	0.43318
<i>Bombus</i> sp. 1	164	185	162.4059	186.5941	0.864171
<i>Bombus</i> sp. 2	16	21	17.21782	19.78218	0.688139
<i>Bombus</i> sp. 3	2	2	1.861386	2.138614	0.889491
<i>Hymenoptera</i> 3	0	1	0.465347	0.534653	0.524506
<i>Lepidoptera</i> 2	1	1	0.930693	1.069307	0.921733
<i>Lepidoptera</i> 3	1	1	0.930693	1.069307	0.921733
<i>Lepidoptera</i> 4	1	0	0.465347	0.534653	0.43318
<i>Hymenoptera</i> 4	2	2	1.861386	2.138614	0.889491
<i>Hymenoptera</i> 5	0	1	0.465347	0.534653	0.524506

3.1.5 Produkcia nektáru

Podľa výsledkov ANOVY sa jednoduchá aj dvojdňová produkcia nektáru u diploidov a tetraploidov signifikantne líši na hladine pravdepodobnosti $p = 0,001$ (viď tab. 14). Tetraploidy produkujú viac nektáru (obr. 15).

Tabuľka 14 Výsledky ANOVY testujúcej vplyv ploidie na 1-dňovú a 2-dňovú produkciu nektáru

produkcia nektáru	Deviance	Resid. Df	$P(> Chi)$
1-dňová	151.94	148	$< 0.001^{***}$
2-dňová	6.5807	50	$< 0.001^{***}$



Obr. 15 Boxploty znázorňujúce jednoduchú (a) a dvojdňovú (b) produkciu nektáru *V. cracca* v závislosti na ploidii

3.1.6 Veľkosť peľových zŕn a ich množstvo

Veľkosť peľových zŕn sa podľa výsledkov ANOVY signifikantne líši v rámci ploidie v každej testovanej veličine (viď tab. 15). Tetraploidy majú peľové zrná väčšie (obr. 17 a, b, c).

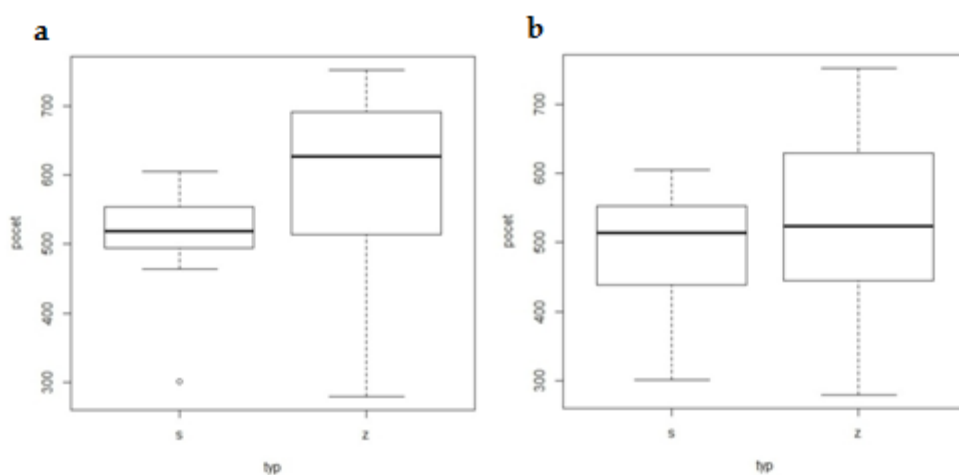
Tabuľka 15 Výsledky ANOVY testujúcej vplyv ploidie na dĺžku, šírku a obsah peľového zrna

peľové zrná	Deviance	Resid. Df	$Pr(>Chi)$
dĺžka	1353.5	148	$< 0.001^{***}$
šírka	151.94	148	$< 0.001^{***}$
obsah	1328536	148	$< 0.001^{***}$

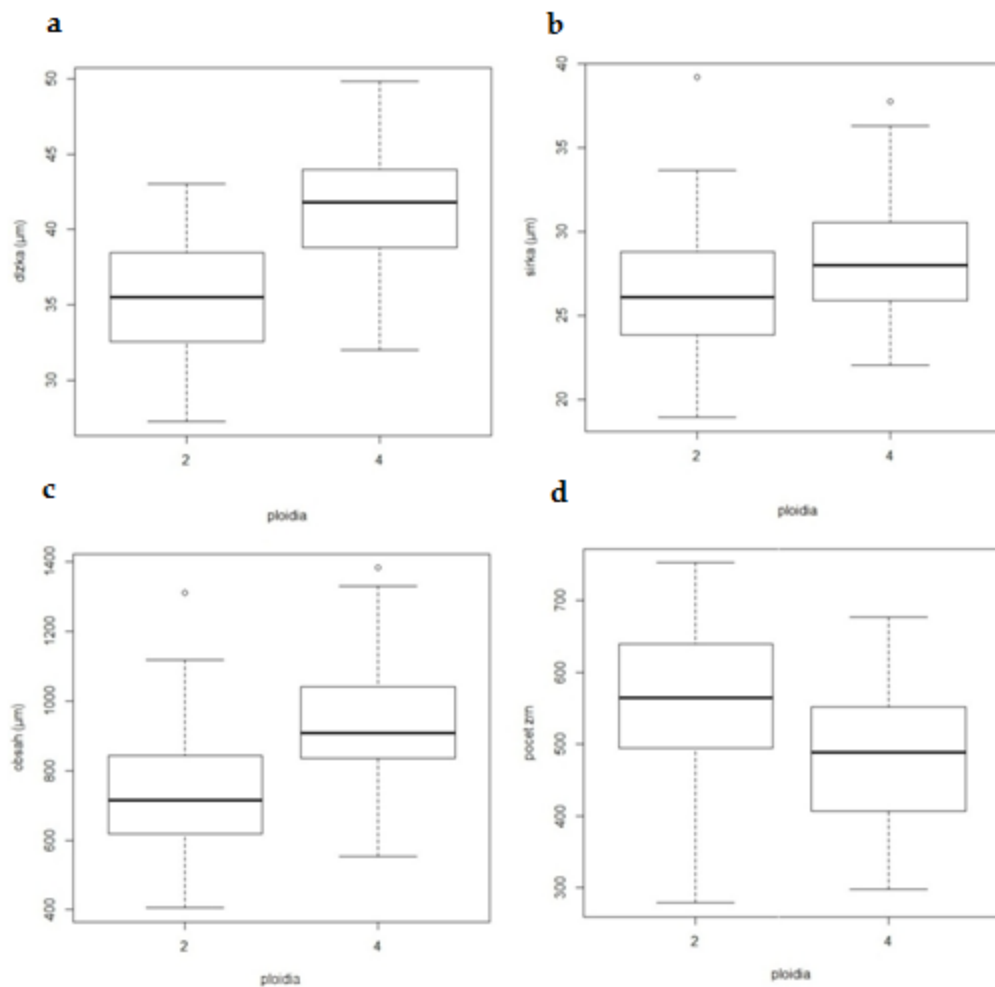
Analýza rozptylu ukázala, že sa počet peľových zŕn líši v závislosti na ploidii (tab. 16). Typ tyčinky je rozhodujúci iba u diploidných jedincov, u tetraploidov nie je rozdiel medzi počtom peľových zŕn, ktoré sa vyvinú na voľnej tyčinke a jednej zo zrastených. Diploidy produkujú viac peľových zŕn ako tetraploidy (viď obr. 17 d). U diploidov aj u tetraploidov je na zrastenej tyčinke vyšší počet peľových zŕn ako na voľnej (obr. 16 a, b).

Tabuľka 16 Výsledky ANOVY testujúcej vplyv ploidie, typu (zrastená/voľná) a kombinácie týchto dvoch premenných na počet peľových zŕn a typu tyčinky v rámci ploidie na počet peľových zŕn v jednej peľnici

počet peľ. zŕn	Deviance	Resid. Df	Pr(>Chi)
ploidia	191.2	59	< 0.001***
typ	57.88	58	< 0.001***
ploidia:typ	24.30	57	< 0.001***
typ (dipl.)	79.771	26	< 0.001***
typ (tetrapl.)	2.4095	31	0.1206



Obr. 16 Boxploty znázorňujúce závislosť počtu peľových zŕn na type tyčinky (s-voľná, z-zrastená) pre diploidný (a) a tetraploidný (b) cytotyp.



Obr. 17 Boxploty znázorňujúce závislosť dĺžky (a), šírky (b) a obsahu (c) peľového zrna a počtu peľových zrn v jednej peľnici (d) *V. cracca* v závislosti na ploidii (2-diploid, 4-tetraploid)

3.1.7 Umelé kríženie

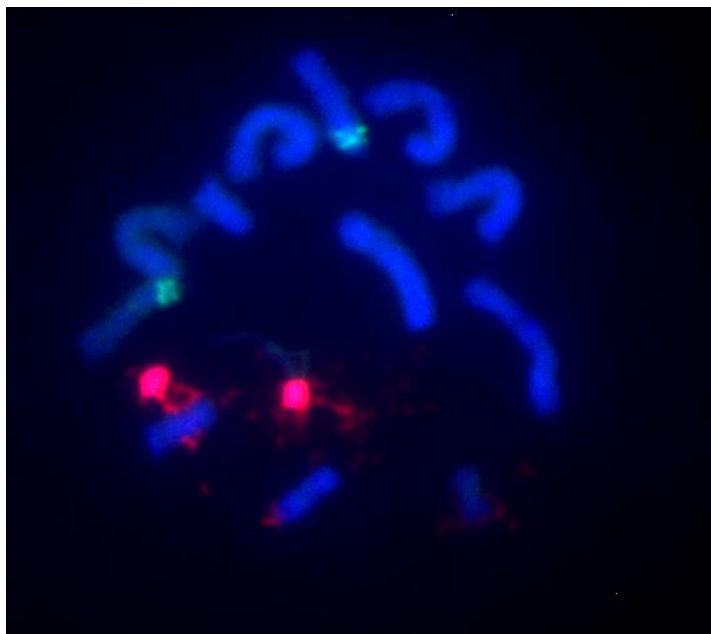
Pokus sa nepodaril, po opelení nevznikli semená, ktoré by som mohla analyzovať.

3.1.8 Zložky reprodukčnej izolácie

Najväčší podiel na reprodukčnej izolácii má priestorová izolovanosť ($RI_{\text{geogr}} = 0,931$), menší podiel správanie opel'ovačov ($RI_{\text{pollinator}} = 0,316$) a zanedbateľný podiel má fenológia ($RI_{\text{phen}} = 0,077$). Koeficient celkovej reprodukčnej izolácie $RI_{\text{total}} = 0,956$.

3.2 *In situ* hybridizácia

Táto časť práce je stále v stave optimalizácie. Podarilo sa mi vyizolovať DNA z diploidnej *V. cracca*, ktorá sa môže použiť na prípravu sondy k riešeniu otázky (6). Izolovala som DNA aj z *V. incana* a *V. dalmatica*, ktorá sa môže použiť pri skúmaní pôvodu tetraploidnej *V. tenuifolia* (otázka (7)). Po aplikácii enzýmu- 2% roztoku celulázy na 50 minút som pripravila roztlak diploidnej *V. cracca*, vid' obr. 18.



Obr. 18 Roztlak diploidnej *V. cracca* ($2n=14$), FISH označená 5S-rDNA (zelená) a 45S-rDNA (červená).

4 Diskusia

Doba kvitnutia diploidov a tetraploidov druhu *Vicia cracca* sa podľa mojich pozorovaní skoro úplne prekrývala, pričom tetraploidy dokvitali 30. 7. a diploidy 2. 8. Vrchol kvitnutia bol u tetraploida o 9 dní neskôr. Koeficient prekryvu kvitnutia cytotypov predstavoval 64 %. Segraves & Thompson (1999) konštatujú, že trvanie sezóny kvitnutia *Heuchera grossulariifolia* sa podobne ako u viky medzi ploidiami nelíšilo. Dĺžka kvitnutia sa nelíšila, ale doba kvitnutia sa nikdy úplne neprekrývala. Petit (1997) zaznamenal rozdiel v začiatku kvitnutia medzi parapatrickými diploidmi a tetraploidmi druhu *Arrhenatherum elatius* pozorovanými v kontrolovaných podmienkach v oboch režimoch (plne osvetlené slnečným svetlom aj 50% zatienené). Allopatrické tetraploidy a diploidy sa v plne osvetlenom režime v kvitnutí na rozdiel od viky prekrývali len mierne. Doba kvitnutia parapatrických diploidov a tetraploidov sa na rozdiel od terénnych podmienok signifikantne nelíšila ani v jednom režime. Jersáková *et al.* (2010) zaznamenala signifikantný rozdiel vo vrchole kvitnutia medzi cytotypmi rodu *Gymnadenia*: tetraploidná *G. conopsea* kvitla signifikantne skôr ako oktoploidná *G. conopsea* aj tetraploidná *G. densiflora*. Kvitnutie *G. conopsea* je podobné vike v tom, že cytotyp s menším počtom chromozómov má vrchol kvitnutia skôr. Husband & Schemske (2000) zistili, že diploidy druhu *Chamerion angustifolium* začali kvitnúť o jedno pozorovanie skôr, oba cytotypy kvitli naraz počas 4 pozorovaní. Koeficient prekryvu, ktorý berie do úvahy proporcie z celkového počtu kvitnúcich rastlín, bol 51%, čo je o 13 % percent menej ako u viky podľa mojich pozorovaní.

Práve v dobe fenoloického prekryvu som v zmiešanej diploidno-tetraploidnej populácii *V. cracca* pozorovala opeľovače. Pri pozorovaní "Budča" sa dva druhy opeľovačov správali inak ako náhodne: *Bombus pascuorum* preferoval tetraploidné rastliny a *Andrena* sp. diploidné. V kontraste s mojimi výsledkami Jersáková (2010) uvádza, že ani jedna zo skupín opeľovačov nemala preferenciu voči niektorému z cytotypov rodu *Gymnadenia*, ale boli zaznamenané rozdiely v ich správaní: nočné motýle z rádu Sphingidae mali správanie signifikantne odlišné od náhodného, zatiaľčo príslušníci rádu Noctuidae sa správali náhodne. Tiež je zaujímavé, že motýle z rádu Sphingidae navštívili behom pozorovania viac súkvetí ako jedinci z rádu Noctuidae. Keď som u viky hodnotila správanie všetkých opeľovačov naraz, nebol ani jeden cytotyp navštevovaný signifikantne častejšie. V kontraste s týmito výsledkami Husband & Schemske (2000) zistili, že

jednotlivé druhy opel'ovačov aj všetky druhy spolu navštevovali častejšie tetraploidy *Chamerion angustifolium* ako bolo očakávané, keby sa správali náhodne. Poradie opel'ovaných rastlín bolo tiež nenáhodné, bolo viac letov medzi tetraploidmi a menej medzi cytotypmi oproti očakávanému počtu podľa frekvencie cytotypov (lety u viky boli častejšie medzi ploidiami ako v rámci ploidii). Dva z troch druhov opel'ovačov *Ch. angustifolium* vykazovali túto heterogenitu; keď sa hodnotili všetky druhy spolu, nebol rozdiel signifikantný. Pomocou počítačových simulácií testovali, či samotné rozmiestnenie rastlín počas pokusu a vzdialenosti, ktoré hmyz počas opel'ovania prekonával by nemohli vysvetliť preferenciu tetraploidov. Aj po odfiltrovaní vplyvu týchto veličín, pozorované frekvencie návštevy tetraploidov boli stále neproporčne častejšie. Všetky tri druhy mali menšiu odchýlku v poradí navštívených rastlín od náhodného očakávaného správania a iba jeden druh opel'ovača vykazoval signifikantný rozdiel. Opel'ovače častejšie navštívili viac ako jeden kvet u tetraploidov. Veľkosť kvetu, počet otvorených kvetov a výška súkvetia spolu vysvetlili signifikantnú časť variability v počte návštev na každom súkvetí a v počte navštívených kvetov na súkvetie. Podobne ako u mnou skúmanej viky, kde priemerný počet návštev nebol signifikantne rozdielny medzi ploidiami, sa podľa Segreaves & Thompson (1999) počet návštev za hodinu medzi ploidiami *Heuchera grossulariifolia* nelíšil. Rozdiel však zaznamenal v druhovom zložení skupiny opel'ovačov, ktoré navštevovali jednotlivé plodie. Toto zloženie sa dokonca menilo počas vegetačnej sezóny. Z 15tich druhov opel'ovačov šesť navštevovalo iba jeden cytotyp alebo navštevovalo jeden cytotyp častejšie. U viky žiadny pravidelný opel'ovač (viac ako tri návštevy počas celého pozorovania) nebol cytotypovo špecifický, dva však mali preferenciu voči niektorému z cytotypov. Z mojich dát vyplýva, že opel'ovače na lokalitách "Průhonice 2" a "Budča" sa správajú inak ako náhodne pri preletoch medzi rastlinami z hľadiska ploidie, ale na lokalite "Průhonice 1" bolo správanie náhodné. To, že pri pozorovaniach "Průhonice 2" a "Budča" opel'ovače preferujú prelety medzi ploidiami a pri pozorovaní "Průhonice 1" nebol zaznamenaný žiadny "pattern" môže byť zapríčinené viacerými faktormi. Jednak počas pozorovania "Průhonice 1" boli rastliny rozmiestnené náhodne a pri oboch pozorovaniach v roku 2014 boli v pravidelnej štvorcovej mriežke (viď obr. 4), takže opel'ovač to mal asi 1,4-krát ($\sqrt{2}$) ďalej na rastlinu rovnakej ploidie ako na rastlinu inej. Schéma rozmiestnenia by sa pri ďalších pozorovaniach mohla upraviť tak, aby boli rovnaké vzdialenosti a zároveň polovica susedov bola diploidná a polovica tetraploidná. Ďalší rozdiel medzi pozorovaním "Průhonice 1" a ďalšími dvoma bol v počte zaznamenaných preletov, pre "Průhonice 1" mám výrazne menej záznamov.

Tento potencionálny nedostatok by však mala odfiltrovať použitá Yatesova korigácia Chí-kvadrát testu.

Pri ďalšom výskume v tejto oblasti by bolo vhodné sledovať čas, ktorý strávi opel'ovač na jednom kvete (Dafni 1992). Ďalším spresnením by bolo spočítať každý pozorovací deň počet kvitnúcich súkvetí na každej rastline (Dafni 1992). Tým by sme získali lepšiu predstavu o pomere dostupných odmien ponúkaných jednotlivými ploidiami. Tak by sa dalo presnejšie určiť, či nie sú v niektorom časovom období jedince jednej ploidie atraktívnejšie len preto, že ich kvitne viac.

To, že na rozdiel od iných štúdií podľa mojich pozorovaní opel'ovače jednoznačne nepreferujú tetraploidné rastliny by mohlo byť spôsobené tým, že v iných systémoch sú peľové zrná tetraploidov väčšie a zároveň ich je rovnako alebo viac. Mne však vyšlo, že peľové zrná tetraploidov sú síce väčšie ako u diploidov, ale je ich signifikantne menej. V práci Tate & Simpson (2004) bol naopak pozorovaný menší peľ u tetraploidov rodu *Tarasa* (*Malvaceae*). Táto skutočnosť vysvetľujú zmenou životnej formy z trvaliek u diploidov na jednoročné rastliny u tetraploidov a zmenou spôsobu opel'ovania z xenogamie u diploidov na autogamiu u tetraploidov. Ďalším faktorom, ktorý by mohol vysvetliť tento stav, je posun areálu od nižších polôh, v ktorých sa vyskytujú diploidné druhy k vyšším polohám s extrémnejšími podmienkami (chladnejšie a suchšie prostredie vystavené vyšším dávkam UV žiarenia), kde rastú tetraploidy. Na novo osídlených stanovištiach s krátkou vegetačnou sezónou a vzácnejším výskytom opel'ovačov im prechod z xenogamie ku autogamii mohol zvýšiť úspešnosť reprodukcie. Dôsledkom autogamie pravdepodobne je výrazná redukcia veľkosti kvetov. Zmeny ako u rodu *Tarasa* sa však počas polyploidizácie *Vicia cracca* nestali, obidve úrovne ploidie sú xenogamné trvalky. Peľové zrná majú tetraploidy signifikantne väčšie ako diploidy v súlade s očakávaním, pretože veľkosť buniek je u vyšších ploidí väčšia (Stebbins 1971). Aj Marinho *et al.* (2014) študoval závislosť veľkosti peľových zŕn na ploidii u dvoch druhov rodu *Eriotheca*. Tiež zaznamenal signifikantne väčšie peľové zrná u rastlín s vyššou ploidiou. Počet peľových zŕn v jednej peľnici u *V. cracca* bol u tetra ploidov menší, čím sa atraktivita diploidov a tetraploidov z hľadiska peľu vyrovnáva.

Ďalšia vlastnosť tetraploidov, ktorá by mohla zvýšiť ich atraktivitu pre opel'ovače, je vyššia produkcia nektáru. Tú sa mi podarilo ukázať u študovaného taxónu. Napriek tomu, že tetraploidy by mali byť vďaka väčšiemu množstvu nektáru pre opel'ovačov atraktívnejšie,

väčšina štatistických analýz správania opel'ovačov to neodráža: (1) pri preletoch z rastliny na rastlinu buď preferovali opačnú ploidiu alebo sa správali náhodne; (2) ani jeden cytotyp nebol atraktívnejší tak, že by po jeho návšteve zostali signifikantne častejšie v záhone ako odleteli preč; (3) počet návštev na rastline ani priemerný počet navštívených kvetov nebol u tetraploidov signifikantne vyšší (len pri pozorovaní "Prúhonice 1" je viac návštev na tetraploidných rastlinách, nie je to však signifikantné ($p=0.08$)). Keď som skúmala správanie z hľadiska druhov hmyzu, zistila som, že na lokalite "Budča" sa dva druhy opel'ovačov správali nenáhodne: *Bombus pascuorum* preferoval tetraploidné rastliny a *Andrena* sp. diploidné. To by mohlo súvisieť s veľkosťou opel'ovačov. Väčší *B.pascuorum* potrebuje viac potravy a tetraploidné kvety majú vyššiu produkciu nektáru. Menšej *Andrena* sp. sa možno k nektáru dostane ľahšie v diploidnom kvete. Eliášová (2008) zistila, že veľkosť striedky, dĺžka člnku a šírka krídla sú vlastnosti, ktoré sa najvýraznejšie líšia medzi cytotypmi. Tieto rozdiely však sú veľmi malé, pravdepodobne nerozlišiteľné ani pre opel'ovačov. To by mohlo vysvetliť prečo aj napriek väčším ponúkaným odmenám u tetraploidov sa nepodarilo okrem jedného druhu opel'ovača zaznamenať signifikantnú preferenciu tohto cytotypu. Davis *et al.* (1994) skúmali množstvo cukrov v nektári jedného kvetu a objem nektárií haploidnej, diploidnej a tetraploidnej *Brassica rapa* a allotetraploida *B. napus*. Priemerný objem nektárií haploidnej *B. rapa* bol signifikantne nižší ako priemerné objemy nektárií ostatných ploidii. Napriek rozdielom vo veľkosti kvetov sa objem nektárií *B. napus* a diploidnej a tetraploidnej *B. rapa* signifikantne nelíšil. Podobne aj množstvo cukrov v nektári z jedného kvetu bolo signifikantne nižšie u haploidnej *B. rapa* ako u diploidného a tetraploidného cytotypu, ale medzi diploidným a tetraploidným cytotypom sa signifikantne nelíšilo.

Metódou *in situ* hybridizácie som po úprave postupu pripravila jeden roztlak diploidnej *V. cracca*. Keď som sa postup opakovala s tetraploidnou *V. cracca*, už sa mi nepodarilo získať dobrý preparát. Metóda vyžaduje ďalšiu optimalizáciu. Ako alternatívny zdroj cieľovej DNA sa môžu použiť puky kvetov.

5 Záver

Reprodukčné bariéry medzi diploidným a tetraploidným cytotypom druhu *V. cracca* sú veľmi silné. Najviac k tomu prispieva priestorová izolácia. Napriek tomu, že som pozorovala určitý fenologický posun, stále existuje nezanedbateľný prekryv v kvitnutí cytotypov. Navyše oba cytotypy navštevujú rovnaké druhy opel'ovačov, čím sa umožňuje prenos peľu medzi jedincami rôznych ploidíí a teda prereprodukčné bariéry v zmiešaných populáciách nie sú rozhodujúce. Jedince s triploidným cytotypom, ale vznikajú len veľmi vzácné. Mne sa ich v skúmanej populácii vôbec nepodarilo identifikovať, Eliášová (2008) však našla 8 triploidov medzi 6 613 jedincami z rôznych lokalít v Českej republike a na Slovensku. To ukazuje na existenciu postreprodukčných bariér, medzi ktoré patria (1) mechanická izolácia – rozdiely v stavbe kvetu, ktoré zabraňujú prenosu peľu, (2) gametická izolácia – samčia a samičia gaméta nesplynú alebo sú neživotaschopné, (3) znížená životaschopnosť zygóty (zygóty krížencov sa nevyvinú), (4) znížená životaschopnosť jedinca (nedospeje do štádia pohlavnej zrelosti), (5) znížená plodnosť krížencov (neprodukujú funkčné gaméty). Z týchto môžeme vylúčiť (1), keďže medzi cytotypmi je síce signifikantný rozdiel v tvare niektorých korunných lupienkov, je takmer nemožné rozoznať ho pozorovaním (Eliášová 2008) a teda pre opel'ovačov pravdepodobne nie je rozlíšiteľný. Vzhľadom k tomu, že nejaké triploidné jedince v zmiešaných populáciách vznikajú, bariéra (2) nie je úplne účinná. Dospelých triploidov však je len minimálne množstvo, takže vývin sa zastaví niekde medzi bariérami (2) až (4). Keďže majú triploidy ($3x = 21$) nepárny počet chromozómov, len veľmi ťažko môžu vznikať funkčné gaméty (5) a triploidy sa teda veľmi pravdepodobne môžu rozmnožovať len nepohlavne (výhonkami z koreňov, Aarssen *et al.* 1986) a šíriť sa len pomaly.

6 Použitá literatura:

Aarssen L. W., Hall I. V. & Jensen K. I. N. (1986) The biology of Canadian weeds 76. *Vicia angustifolia*, *Vicia cracca*, *Vicia sativa*, *Vicia tetrasperma*, and *Vicia villosa*. *Canadian Journal of Plant Science*, **66**(3): 711-738.

Baack E. J. (2005) Ecological factors influencing tetraploid establishment in snow buttercups (*Ranunculus adoneus*, *Ranunculaceae*): minority cytotype exclusion and barriers to triploid formation. *American Journal of Botany*, **92**(11): 1827–1835.

Bailey J. P., Bennett S. T., Bennett M. D. & Stace C. A. (1993) Genomic *in situ* hybridization identifies parental chromosomes in the wild grass hybrid \times *Festulopia hubbardii*. *Heredity* **71**: 413-420.

Borges L. A., Souza L. G. R., Guerra M., Machado I. C., Lewis G. P. & Lopes A. V. (2012) Reproductive isolation between diploid and tetraploid cytotypes of *Libidibia ferrea* (= *Caesalpinia ferrea*) (Leguminosae): ecological and taxonomic implications. *Plants Systematics and Evolution*, **298**: 1371–1381.

Brochmann C. (1992) Pollen and seed morphology of Nordic *Draba* (*Brassicaceae*): phylogenetic and ecological implications. *Nordic Journal of Botany*, **12**: 657-673.

Butterfass Th. (1987) Cell volume ratios of natural and of induced tetraploid and diploid flowering plants. *Cytologia* **52**: 309-316.

Castro S., Münzbergová Z., Raabová J. & Loureiro J. (2011) Breeding barriers at a diploid–hexaploid contact zone in *Aster amellus*. *Evolution & Ecology*, **25**: 795–814.

Córdoba S.A. & Cocucci A.A. (2011) Flower power: its association with bee power and floral functional morphology in papilionate legumes. *Annals of Botany*, **108**: 919–931.

Coyne J. A. & Orr H. A. (1998) The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*, **353**: 287-305.

Dafni A. (ed.) (1992) Pollination ecology: A practical approach. Oxford University Press, New York, pp 250.

Davis A. R., Sawhney V.H., Fowke L. C. & Low N. H. (1994) Floral nectar secretion and ploidy in *Brassica rapa* and *B. napus* (*Brassicaceae*). I. Nectary size and nectar carbohydrate production and composition. *Apidologie*, **25**: 602-614.

Davis A. R., Sawhney V.H., Fowke L. C. & Low N. H. (1996) Floral nectar secretion and ploidy in *Brassica rapa* and *B. napus* (*Brassicaceae*). II. Quantified variability of nectary structure and function in rapid-cycling lines. *Annals of Botany*, **77**: 223-234.

El-Shanshoury A. R. and Soliman S. A. (1996) Electrophoretic evidence for subgeneric and sectional relationships of some species in *Vicia* L. *Pakistan Journal of Botany*, **28** (2): 173-182.

Eliášová A. *Evaluation of cytotype and morphological variability of Vicia cracca L. (Fabaceae) in central Europe*. Prague, 2008. 84 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.

Endress P. K. (1994) Diveristy & evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press. Cambridge (UK).

Galbraith D., Harkins K., Maddox J., Ayres N., Sharma D. & Firoozabady E. (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, **220**: 1049–1051.

Gao J. Y., Liu Q. & Li Q. J. (2014) The comparative reproductive biology of a tetraploid species, *Hedychium villosum*, and its diploid progenitor *H. tenuiflorum* (*Zingiberaceae*). *Plant Biology*, **16**: 683–689.

Greilhuber J., Temsch E., Loureiro J. (2007) Nuclear DNA content measurement. In: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. [ed.] Flow cytometry with plant cells, 67-101. Weinheim: Wiley-VCH.

Harper J., Armstead I., Thomas A., James C., Gasior D., Bisaga M., Roberts L., King I. and King J. (2011) Alien introgression in the grasses *Lolium perenne* (perennial ryegrass) and *Festuca pratensis* (meadow fescue): the development of seven monosomic substitution lines and their molecular and cytological characterization *Annals of Botany*, **107**: 1313-1321.

Husband B. C. & Sabara H. A. (2003) Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist*, **161**: 703–713.

Husband B.C. & Schemske D.W. (2000) Ecological mechanisms of reproductive isolation between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. *Journal of Ecology*, **88**: 689–701.

Jersáková J., Castro S., Sonk N., Milchreit K., Schödelbauerová I., Tolasch T. & Dötterl S. (2010) Absence of pollinator-mediated premating barriers in mixed-ploidy populations of *Gymnadenia conopsea* s.l. (Orchidaceae). *Evolution & Ecology*, **24**: 1199–1218.

Kupicha F. K. (1976) The infrageneric structure of *Vicia*. *Royal Botanical Garden*, **34**: 287–326.

Lewis W. H. (1980) Polyploidy in species populations. In W. H. Lewis [ed.], *Polyploidy biological relevance*, 103–144. Plenum Press, New York, New York, USA.

Liu L.-Q. & Gu Z.-J. (2011) Genomic in situ hybridization identifies genome donors of *Camellia reticulata* (Theaceae). *Plant Science*, **180**: 554–559.

Loureiro J., Kopecký D., Castro S., Santos C., & Silveira P. (2007) Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Peninsula *Festuca* sp. *Plant Systematics and Evolution*, **269**(1-2): 89–105.

Lydaki M. E. & Vlahos J. C. (2000) Natural and artificial pollination of *Ebenus cretica* L. *Acta Horticulturae*, **541**: 113–117.

Marasek A., Hasterok R., Wiejacha K. & Orlikowska T. (2004) Determination by GISH and FISH of hybrid status in ornamental lilies. *Hereditas*, **140**: 1–7.

Marinho R. C., Mendes-Rodrigues C., Bonetti A. M. & Oliveira P. E. (2014) Pollen and stomata morphometrics and polyploidy in *Eriotheca* (Malvaceae-Bombacoideae). *Plant Biology*, **16**: 508–511.

Masoudi-Nejad, Nasuda S., McIntosh R. & Endo T. R. (2002) Transfer of rye chromosome segments to wheat by a gametocidal system. *Chromosome Research: An*

International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology, **10(5)**: 349–57.

Nagl W. (1978) Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution: towards an understanding of quantitative and qualitative variation of nuclear DNA in ontogeny and phylogeny. North-Holland Publishing, New York, New York, USA.

Otto F. (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman D.Z. (ed) *Methods in cell biology*. Academic Press, New York, pp 105–110.

Pellegrino K. C. M., dos Santos R. M. L., Rodrigues M. T., Laguna M. M., Amaro R. C. & Yonenaga-Yassuda Y. (2009) Chromosomal Evolution in the Brazilian Geckos of the Genus *Gymnodactylus* (Squamata, Phyllodactylidae) from the Biomes of Cerrado, Caatinga and Atlantic Rain Forest: Evidence of Robertsonian Fusion Events and Supernumerary Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, **127**:191–203.

Petit Ch., Lesbros P., Ge X. & Thompson J. D. (1997) Variation in flowering phenology and selfing rate across a contact zone between diploid and tetraploid *Arrhenatherum elatius* (Poaceae). *Heredity*, **79**:31–40.

Ramsey J., Bradshaw H. D. & Schemske D. W. (2003) Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae), *Evolution*, **57(7)**: 1520–1534.

Renny-Byfield S., Ainouche M., Leitch I. J., Lim K. Y[†], Le Comber S. C. and Leitch A. R. (2010) Flow cytometry and GISH reveal mixed ploidy populations and *Spartina* nonaploids with genomes of *S. alterniflora* and *S. maritima* origin. *Annals of Botany*, **105**: 527-533.

Rieseberg L. H., Carney S. E. (1998) Plant hybridization. *New Phytologist*, **140**: 599–624.

Rosa K. O., Ziemniczak K., de Barros A. V., Nogaroto V., Almeida M. C., Cestari M. M., Artoni R. F. & Vicari M. R. (2012) Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **22**:739-749.

Rousi A. (1961) Cytotaxonomical studies on *Vicia cracca* L. and *V. tenuifolia* Roth. I. Chromosome numbers and karyotype evolution. *Hereditas*, **47**: 81-110.

Schwanitz F. (1952) Einige kritische Bemerkungen zur Methode der Bestimmung der Polyploidie durch Messung der Pollen- und Spaltöffnungsgröße. *Zuchter*, **22**: 273-275.

Segraves A. & Thompson J.N. (1999) Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution*, **53**(4): 1114-1127.

Simpson B. B. & Neff J. N. (1983) In *Handbook of Experimental Pollination Biology* (ed. Jones C. E. & Little R. J.), p. 142 Van Nostrand Reinhold, New York.

Small E. (1983) Pollen ploidy-prediction in the *Medicago sativa* complex. *Pollen et Spores*, **25**: 305-320.

Stebbins G. L. (1950) Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York, New York, USA.

Stebbins G. L. (1971): Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley, London.

Tang F., Chen F., Chen S., Wang X. & Zhao H. (2010) Molecular cytogenetic identification and relationship of the artificial intergeneric hybrid between *Dendranthema indica* and *Crossostephium chinense* by GISH. *Plant Systematics & Evolution*, **289**: 91-99.

Tate J. A. & Simpson B. B. (2004) Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. *American Journal of Botany*, **91**(2): 207–213.

Trávníček P., Eliášová A. and Suda J. (2010) The distribution of cytotypes of *Vicia cracca* in Central Europe: the changes that have occurred over the last four decades. *Preslia*, **82**: 149-163.

Tu Y., Sun J., Ge X. and Li Z. (2009) Chromosome elimination, addition and introgression in intertribal partial hybrids between *Brassica rapa* and *Isatis indigotica*. *Annals of Botany*, **103**: 1039-1048.

Wolf D. (2006) Nectar sugar composition and volumes of 47 species of Gentianales from a southern Ecuadorian mountain forest. *Annals of botany* **97**: 767-777.

Web 1: http://en.wikipedia.org/wiki/Vicia_cracca, 28. 4. 2013

Web 2: http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_in_situ_hybridization, 1. 8. 2014

Web 3:

<http://huntinghills.rdpsd.ab.ca/docs/homework/Thursday%20Nov%203%20-%20AP%20Bio%2020.pdf>, 1. 8. 2014

Príloha A: Protokoly k ISH

Príprava sondy

1 µg DNA som pridala do 16 µl redistilovanej vody, potom som pridala 4 µl DIG-Nick (Biotin-Nick) Translačnej zmesi (Roche, USA) a centrifugovala. Následne som nechala zmes inkubovať 90 min pri tep. 15°C. Reakciu som zastavila pridaním 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) a zahriatím na 10 min na 65°C. Produkt som zliala do 1-2 skúmaviek, pridala som 1/10 z objemu vzorky 3 M octanu sodného (pH 5,2) a zamiešala. Pridala som 2 objemy (vzorky DNA) čistého alkoholu. DNA som nechala vyzrážať sa pri teplote -70 alebo -80°C polhodinu alebo dlhšie. Potom som zmes centrifugovala 30 min pri teplote -4°C rýchlosťou 14.000 rpm, vyliala som supernatant a zvyšky odstránila pipetou. Pelet som premyla 70 % etanolom, nechala odstáť 5-10 min, a znovu chvíľu centrifugovala pri 14.000 rpm. Vyliala som supernatant, odstránila zvyšky pipetou a vysušila DNA vo vákuu 5-10 min. DNA som rozpustila v TE, okolo 1/3 počiatočného objemu označovacej reakcie.

Takto pripravená sonda sa môže skladovať pri teplote -20°C dlhšiu dobu.

Príprava chromozómových roztlakov

Zber + fixácia

Najskôr som odobrala končeky mladých koreňov (ráno/doobeda medzi 11:00–13:00) a dala na 27–40 hod do ľadovej vody. Korienky som následne fixovala v 3:1 (96 % etanol: kys. octová) 7 dní pri teplote 37°C.

- a. Pre okamžité použitie som korienky farbila 2 hod v 1 % acetokarmíne a roztláčila (squashing)
- b. Na dlhšie uschovanie zamrazila pri -20°C a po uschovaní farbila v acetokarmíne 2 hod, (pre ďalšie uschovanie znovu zafixovala v 3:1 a zamrazila)

Squashing (roztláčenie)

Podložné sklíčko uložené najmenej dva dni v etanole som dôkladne vyleštila. Odstránila som koreňovú čiapočku z korienka, odrezala asi ½ mm meristému a roztláčila

v kvapke 45 %-nej kyseliny octovej pokiaľ neboli viditeľné žiadne zvyšky pletiva. Sklíčko som mierne zohriala nad plameňom a potom preparát roztlačila pomocou krycieho sklíčka. Preparáty som následne zmrazila na suchom ľade. Odstránila som krycie sklíčko a ihneď vložila do 45 %-nej kyseliny octovej, ktorú som nechala pôsobiť pár sekúnd pri izbovej teplote. Potom som sklíčka preložila na 3 min do 45 %-nej kyseliny octovej s teplotou 50°C, vybrala ich a nechala voľne usušiť. Preparáty sú v tomto štádiu pripravené na okamžité použitie alebo sa môžu niekoľko dní skladovať v chladničke alebo dokonca pri izbovej teplote. Na dlhšie uschovanie je potrebné ich zamraziť pri -20°C v krabici na mikroskopické sklá.

Hybridizácia

Pripravila som (množstvá na 1 ml):

hybridizačný roztok I (stringencia 77 %), bez DNA

- Formamid (deionizovaný, bez nukleáz a proteínáz) 500 µl
- redestilovaná voda 200 µl
- 50 % dextranzásobný roztok 50 %
(= 20 g na 40 ml roztoku/vody) 200 µl
- 20x SSC 100 µl

hybridizačný roztok II (stringencia 87 %), bez DNA

- Formamid (deionizovaný, bez nukleáz a proteínáz) 500 µl
- redestilovaná voda 275 µl
- 50 % dextranzásobný roztok 50 %
(= 20 g na 40 ml roztoku/vody) 200 µl
- 20x SSC 25 µl

hybridizačný roztok III (stringencia 98 %), bez DNA

- Formamid (deionizovaný, bez nukleáz a proteináz) 500 µl
- redestilovaná voda 295 µl
- 50 % dextranásobný roztok 50 %
(= 20 g na 40 ml roztoku/vody) 200 µl
- 20x SSC 5 µl

Pripravila som veľké množstvo týchto hybridizačných roztokov a skladovala zmrazené pri -20°C . Podľa potreby sa môže pridať DNA alebo pripraviť úplnú hybridizačnú zmes s DNA a niekoľko mesiacov sa môže skladovať zmrazená.

Pripravila som 20 µl* hybridizačnej zmesi:

- hybridizačný roztok 16 µl
- DNA sonda I 1 µl
- DNA sonda II 1 µl
- Redestilovaná voda 2 µl

*Dostatočné množstvo pre preparát prekrytý krycím sklíčkom 22×40 mm

FISH

Prvý deň:

Skôr ako som začala pracovať, nastavila som inkubátor na 37°C a termocycler na 80°C . Na preparát s roztlakmi chromozómov som napipetovala 20 µl hybridizačnej zmesi a prekryla krycím sklíčkom 22×40 mm. Skláš som na termocycleri zahrievať na 80°C počas 2 min 30 s (denaturácia), následne som ich rýchlo preniesla do vlhkej komôrky (SM 30,

Boeckel Scientific, USA). V nej som ich nechala inkubovať cez noc pri 37°C (max 16 h) – *in situ* hybridizácia.

Druhý deň:

Po hybridizácii som najskôr zmyla krycie sklíčko destilovanou vodou (stričkou), potom som sklá ponorila na 10 min do 2x SSC (aby sa odstránil dextran). Následne som sklá premyla destilovanou vodou a usušila. Na každé sklíčko som napipetovala 30 µl detekčného roztoku, ktorý obsahuje 1,5 µl anti-DIG FITC (1:200; 200 µg/ml, Roche, USA) a 3 µl Cy3-Streptavidínu (1:100; 1 µg/ml, Sigma Aldrich, USA) v 1x blokujúcom reaktante (Vector Laboratories, USA) a prikryla krycím sklíčkom. Následne som nechala sklá inkubovať 1-2 hodiny pri 37°C. Po inkubácii som pod prúdom vody zmyla krycie sklíčko, premyla destilovanou vodou, usušila, a pridala 12 µl uzatváracieho média Vectashield (Vector Laboratories, USA). V tomto stave boli preparáty pripravené na pozorovanie pod fluorescenčným mikroskopom.